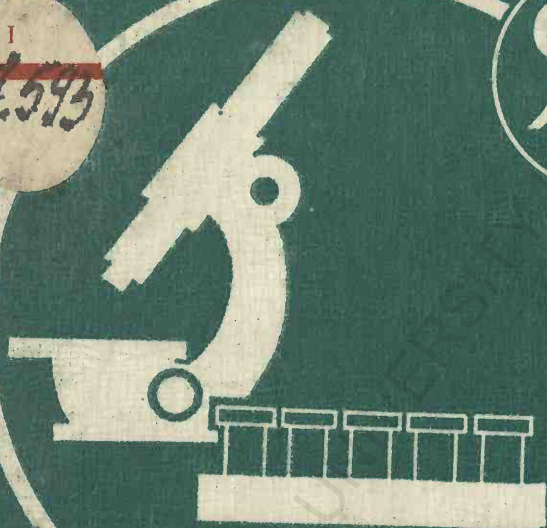


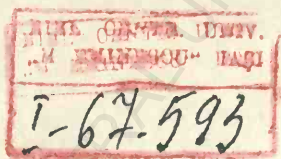
I
~~64.593~~



GABRIELA ȘERBĂNESCU-JITARIU • MARIN ANDREI
NATALIA RĂDULESCU-MITROIU • ELENA PETRIA

PRACTICUM

de biologie vegetală



Conf. Dr. doc.

GABRIELA ȘERBĂNESCU-JITARIU

Conf. Dr. MARIN ANDREI

Lector Dr. NATALIA RĂDULESCU-MITROIU

Lector Dr. ELENA PETRIA

CUPRINS

PRACTICUM

de biologie vegetală

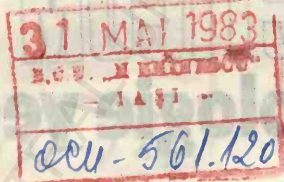


Editura CERES
București, 1983

Redactor : ing. MARIA DAMIAN

Tehnoredactor : EUGENIA CERNEA

Coperta : FRANCISC KALAB



3
Editura CERES
Iași, 1983

CUPRINS

INTRODUCERE	9
Capitolul I APARATURA ȘI USTENSILE DE LABORATOR	13
1.1. Microscopul și accesoriile sale	14
1.1.1. Partea mecanică a microscopului	15
1.1.2. Partea optică a microscopului	18
1.1.3. Aberația sferică și cromatică	19
1.1.4. Apertura numerică (A.N.)	22
1.1.5. Puterea de rezoluție (de separare)	22
1.1.6. Modul de formare a imaginii	24
1.1.7. Determinarea puterii de mărire a microscopului	24
1.1.8. Grosimentul microscopului	25
1.1.9. Sistemul de iluminare	27
1.1.10. Accesoriile microscopului	28
1.2. Cum se face un desen la microscop	34
1.3. Stabilirea măririi desenului executat la camera clară	34
1.4. Tipuri de microscopae. Microscopae I.O.R.	35
1.4.1. Microscopul de laborator tip M.L.3	36
1.4.2. Microscopul de laborator tip M.I.3	36
1.4.3. Microscopul școlar tip M.S.3	36
1.4.4. Microscopul de buzunar	37
1.4.5. Microscopul cu fond negru cu câmp întunecat	37
1.4.6. Microscopul cu contrast de fază	39
1.4.7. Microscopul cu raze ultraviolete	40
1.4.8. Microscopul cu fluorescență	41
1.4.9. Microscopul electronic	42
1.5. Lupa. Tipuri de lupe	44
1.6. Termostatul	45

1.7. Autoclavul	46
1.8. Microtomul	47
1.8.1. Tipuri de microtom	47
1.9. Ustensile de laborator	50
1.9.1. Briciul	50

Capitolul II TEHNICA DE EFECTUARE A SECȚIUNILOR ȘI PREPARATELOR MICROSCOPICE 53

2.1. Obținerea secțiunilor de mână	53
2.1.1. Prepararea materialului de secționat	55
2.1.2. Tehnica secționării manuale	55
2.1.3. Materiale necesare secționării obiectelor vegetale	58
2.1.4. Secționarea cu ajutorul măduvei de soc	59
2.1.5. Medii de includere pentru preparate durabile (permanente) și montarea lor	60
2.1.6. Lutarea preparatelor	73
2.2. Includerea materialelor vegetale în diferite medii	74
2.2.1. Etapele necesare includerii în parafină	75
2.2.2. Includerea în alte medii	97
2.3. Secționarea la microtom a obiectelor vegetale incluse în diferite medii	117
2.3.1. Secționarea obiectelor incluse în parafină	118
2.3.2. Accidente în efectuarea secțiunilor	121
2.3.3. Lipirea secțiunilor pe lamă	122
2.3.4. Uscarea secțiunilor	124
2.3.5. Deparafinarea secțiunilor	124
2.3.6. Hidratarea secțiunilor	125
2.3.7. Colorarea secțiunilor	126
2.3.8. Formarea blocurilor de celoidină și montarea acestora pe suporturi	127
2.3.9. Secționarea blocurilor de celoidină	129
2.3.10. Secționarea blocurilor de gelatină	130

Capitolul III FIXATORII 133

3.1. Fixatorii simpli	133
3.1.1. Acidul acetic glacial	133
3.1.2. Acidul cromic	134
3.1.3. Acidul osmic	134
3.1.4. Acidul tricloracetic	136
3.1.5. Alcoolul etilic	136
3.1.6. Biclorigura de mercur (sublimat corosiv — HgCl_2)	137

3.1.7. Bicromatul de potasiu	137
3.1.8. Clorura de zinc ($Zn\ Cl_2$)	138
3.1.9. Formaldehida (formolul)	138
3.1.10. Iodul	139
3.2. Amestecuri fixatoare	140
3.2.1. Amestecuri fixatoare pe bază de alcool	140
3.2.2. Amestecuri fixatoare pe bază de crom	143
3.2.3. Amestecuri fixatoare pe bază de acid osmic	148
3.2.4. Amestecuri diverse	150
Capitolul IV COLORAȚIA ȘI COLORANȚII	154
4.1. Colorarea progresivă	155
4.2. Colorarea regresivă	155
4.3. Coloranții folosiți în tehnicile de microscopie	156
4.4. Coloranții acizi, bazici și neutri, metacromazia	157
4.5. Puritatea colorantului	157
4.6. Coloranții frecvent utilizați în laborator și tehnica de colorare	158
4.6.1. Acetocarmin	158
4.6.2. Acid periodic — Schiff	160
4.6.3. Acid picro și albastru de anilină	161
4.6.4. Acridin-oraj	161
4.6.5. Alaun de crom și alizarin viridina	162
4.6.6. Alaun de crom și potasiu — hematoxilina	163
4.6.7. Alaun de fier și acetocarmin	164
4.6.8. Albastru astra și safranina	165
4.6.9. Albastru de metilen (d. Löffler)	166
4.6.10. Albastru de metilen și roșu de ruteniu	166
4.6.11. Albastru de rezorcină și acid acetic	167
4.6.12. Albastru de rezorcină și galben Martius	167
4.6.13. Albastru de toluidină	168
4.6.14. Albastru de toluidină (d. Sakai)	169
4.6.15. Alizarin viridină și albastru de metilen	169
4.6.16. Apă de iod și eozină	170
4.6.17. Azocarmin B	171
4.6.18. Azotatul mercurilor (reactivul Millon)	171
4.6.19. Bismarck brun	172
4.6.20. Carmin acetic și clorură de litiu	173
4.6.21. Carminul boraxat (d. Grenacher)	174
4.6.22. Clorazolazurină	175
4.6.23. Clorazol și pontacilcarmin	176
4.6.24. Cloriodura de zinc	176
4.6.25. Fast-green (verde rapid)	177

4.6.26.	Colorația Feulgen 1	178
4.6.27.	Colorația Feulgen 2	181
4.6.28.	Feulgen — acid periodic — Schiff	182
4.6.29.	Feulgen — acid periodic — Schiff — galben naftol	182
4.6.30.	Fluoroglucină acidclorhidrică	184
4.6.31.	Fuchsină diamant și NaOH (d. Fuchs)	184
4.6.32.	Fuchsină fenicată (d. Ziehl — Neelsen)	185
4.6.33.	Galocianina și alaunul de crom	186
4.6.34.	Colorația Giemsa	187
4.6.35.	Colorația Gomori	188
4.6.36.	Colorația Gram	189
4.6.37.	Hematoxilina	190
4.6.38.	Hematoxilina cu cloralhidrat	191
4.6.39.	Hematoxilina, crizoidină și Sudan III	192
4.6.40.	Hematoxilina Delafield	193
4.6.41.	Hematoxilina Ehrlich	194
4.6.42.	Hematoxilina Ehrlich	196
4.6.43.	Hematoxilina ferică (d. Heidenhain)	198
4.6.44.	Hematoxilina — mordant (Hemalaunul Mayer)	201
4.6.45.	Iod în iodură de potasiu (soluție iodo-iodurată)	203
4.6.46.	Lactofenol și albastru de anilină	204
4.6.47.	Soluția Lugol	205
4.6.48.	Colorația cu Mucicarmin	205
4.6.49.	Nigrosina și acidul picric	206
4.6.50.	Orceină și acidul acetic	207
4.6.51.	Colorația Pianese	207
4.6.52.	Rodamin B	208
4.6.53.	Roșu de Congo și crizoidină (reactivul Genevez)	209
4.6.54.	Roșu de nucleu	210
4.6.55.	Roșu de ruteniu	210
4.6.56.	Safranină și albastru de anilină	211
4.6.57.	Safranină și Fast-green (verde rapid)	212
4.6.58.	Safranină și Lichtgrün (verde luminos)	213
4.6.59.	Safranină, violet cristal și Lichtgrün	214
4.6.60.	Safranină, violet de metil și Fast green (d. Johansen)	216
4.6.61.	Sudan III și Sudan IV	218
4.6.62.	Sulfat de anilină	219
4.6.63.	Tanin și clorură ferică	219
4.6.64.	Tanin, clorură ferică și hidroxid de sodiu	220
4.6.65.	Verde de iod	221

4.6.66. Verde rapid	222
4.6.67. Violet de gențiană fenicat	222
4.6.68. Violet de metil și pironină	223
4.7. Supracolorări la colorația cu hematoxilină	224
4.8. Variante de preparare a reactivului Schiff	225
4.9. Regenerarea reactivului Schiff	

Capitolul V TEHNICI DE INVESTIGAȚIE A DIFERENȚELOR GRUPE DE PLANTE INFERIOARE

5.1. Bacterii	227
5.2. Cianoficeele	229
5.3. Organisme flagelate	232
5.4. Algele	235
5.5. Diatomee	242
5.6. Ciupercile	245
5.7. Lichenii	250

Capitolul VI TEHNICI CITO-HISTO-EMBRIOLOGICE

6.1. Tehnici citologice	252
6.1.1. Examinarea „in vivo” a nucleului	252
6.1.2. Examinarea nucleului pe material fixat	253
6.1.3. Etalarea prin strivire a materialului vegetal	256
6.1.4. Examinarea „in vivo” a cloroplastelor	259
6.1.5. Examinarea mitocondriilor	260
6.1.6. Examinarea membranelor plasmactice	260
6.1.7. Examinarea sferozomilor	261
6.1.8. Examinarea vacuolelor	261
6.1.9. Examinarea unor substanțe ergastice	262
6.2. Tehnici histologice	262
6.2.1. Fixarea materialului vegetal fără conservarea constituenților celulari	263
6.2.2. Fixarea materialului vegetal cu menținerea constituenților celulari	263
6.2.3. Eliminarea conținutului celular în secțiunile efectuate cu briciul	265
6.2.4. Reacții simple de identificare a constituenților peretelui celular	267
6.2.5. Metode de clarificare a secțiunilor necesare în cercetările anatomice	268
6.2.6. Clarificarea obiectelor foarte coriacee	271
6.2.7. Studiarea fluorescenței primare în secțiunile efectuate cu briciul și la microtom	272

6.2.8. Obținerea unor preparate prin incinerare	274
6.2.9. Includerea scheletelor silicioase	275
6.2.10. Izolarea cuticulei frunzelor	275
6.2.11. Țesuturi meristematice	276
6.3. Tehnici embriologice	280
6.3.1. Microsporii și gametofitul masculin	280
6.3.2. Macrosporii și gametofizii feminini	291

Bibliografie selectivă	294
----------------------------------	-----

I.C.H. M. ENESCU 1971

INTRODUCERE

Dezvoltarea științelor biologice, în general, nu ar fi fost posibilă fără aportul imens al cunoașterii concrete a vieții. Aceasta a presupus, pe lângă observarea fenomenelor la nivel macroscopic, și cunoașterea aprofundată a materiei vii la nivel celular, molecular și atomic.

Investigațiile pînă la nivel molecular și atomic efectuate în zilele noastre nu ar fi fost posibile fără perfecționarea continuă a tehnicii de cercetare și a procedeele de preparare prealabilă a materialului biologic.

Cu toate aceste performanțe, cercetările biologice la nivel celular, cu ajutorul microscopului optic, sînt în plină desfășurare, ele fiind solicitate mai ales de domeniile cu aplicabilitate practică ale biologiei contemporane.

Deși puterea de rezoluție a microscopelor optice este limitată, procedeele de prelucrare ale materialului biologic sînt nelimitate.

Lucrarea pe care o prezentăm se referă tocmai la o serie de posibilități de pregătire a preparatelor în vederea analizei lor la microscopul optic. Trebuie să subliniem faptul că puterea de rezoluție a microscop-

pului, indiferent de sistemele optice cu care este prevăzut, nu constituie decît unul din elementele importante ale unei cercetări eficiente. Un alt element, la fel de necesar, îl reprezintă efectuarea preparatelor durabile în vederea examinării lor la microscop. În Practicum de biologie vegetală sînt prezentate etapele de prelucrare ale unui material vegetal care urmează a fi cercetat la microscopul optic: fixarea materialului, includerea lui în vederea secționării, secționarea cu mîna servindu-ne de brici sau de microtom, colorarea și montarea lui în preparate durabile. Substanțele și procedeele concrete de lucru prezentate în lucrare sînt valabile pentru cercetările cito-histo-embriologice la plante.

Lucrarea de față se adresează specialiștilor din domeniul biologiei aplicate, din institutele de cercetări, cadrelor didactice din învățămîntul de toate gradele, studenților și celor cu preocupări în domeniul biologiei vegetale.

Autorii consideră că lucrarea Practicum de biologie vegetală va umple un gol de mult resimțit în cercetările biologice de laborator și își exprimă speranța că ea va contribui efectiv la pregătirea de noi specialiști în domeniul biologiei aplicate.

Această lucrare vine în întîmpinarea cerinței formulate de conducerea partidului și statului nostru socialist, care acordă prioritate cercetării în domeniul științelor biologice și agricole în etapa actuală de dezvoltare a societății.

Colectivul de autori aduce și pe această cale profesorului Dr. docent I. T. T a r n a v s c h i, mulțumiri pentru sugestiile și îndrumările date în elaborarea acestei lucrări.

Autorii vor primi cu satisfacție eventualele sugestii menite să ajute la completarea lucrării de față, făcînd-o mai cuprinzătoare decît s-a reușit în prezenta ediție.

Tuturor celor care ne vor face cunoscute sugestiile, în scopul amintit, le aducem cu anticipație mulțumiri.

AUTORII

APARATURA ȘI USTENSILE DE LABORATOR

Invențiunea microscopului a reprezentat o adevărată cutură în dezvoltarea științelor biologice. După datele bibliografice, primul microscop s-a aparut spre sfîrșitul secolului al XVI-lea și începutul secolului al XVII-lea. Numele primului inventator nu se cunoaște cu precizie. Se pare că Galileo Galilei este cel care folosește pentru prima dată un microscop construit de el. După alte surse, primul microscop a fost construit de detalierea olandeză Hans și Zacharias Jansen.

Unul din primele microscopuri cu două lentile și cu un crescînt de $500 \times$ a fost acela al lui Robert Hooke și apar în Antony van Leeuwenhoek.

La începutul secolului al XVIII-lea s-a introdus cercetarea materialului biologic prin transparentă. Utilizarea microscopului cu o lentilă a avut loc abia în anul 1704.

Cercetările asupra microscopului s-au intensificat și au fost făcute descoperiri importante de către primii cercetători care le-au utilizat.

Descoperirea ulterioară a structurilor biologice a determinat perfecționarea microscopului. Cu ajutorul lui s-a putut demonstra că toate cele vii — ani-

Capitolul I

APARATURĂ ȘI USTENSILE DE LABORATOR

Inventarea microscopului a reprezentat o adevărată cotitură în dezvoltarea științelor biologice. După datele bibliografice, primele microscopae apar spre sfârșitul secolului al XVI-lea și începutul secolului al XVII-lea. Numele primului inventator nu se cunoaște cu precizie. Se pare că Galileo Galilei este cel care folosește pentru prima dată un microscop construit de el. După alte surse, primul microscop a fost construit de șlefuitorii olandezi Hans și Zacharias Jansen.

Unul din primele microscopae cu două lentile și cu un grosiment de 300 x a fost acela al lui Robert Hooke și apoi al lui Antony von Leeuwenhoek.

La început obiectele erau examinate în lumina reflectată. Mai târziu (sec. XVII), s-a introdus cercetarea materialului biologic prin transparentă. Utilizarea microscopului cu oglindă a avut loc abia în anul 1704.

Cu ajutorul acestor microscopae rudimentare au fost făcute descoperiri uimitoare de către primii cercetători care le-au utilizat.

Dezvoltarea ulterioară a științelor biologice a determinat și perfecționarea microscopului. Cu ajutorul lui s-a putut demonstra că întreaga lume vie — ani-

mală și vegetală — este unitară, prin structura celulară comună.

Dezvoltarea tehnicii din ultimele decenii, extinderea metodelor de cercetare din fizică și chimie, au permis citologiei și histologiei să pătrundă în profunzimea proceselor ce au loc la nivel molecular sau submolecular. Acest lucru s-a făcut prin perfecționarea neîncetată a aparaturii de investigație.

Instrumentul la care se apelează ori de câte ori se cercetează o celulă sau un țesut este microscopul.

1.1. MICROSCOPUL ȘI ACCESORIILE SALE

În secolul al XIX-lea și mai cu seamă în secolul al XX-lea, odată cu perfecționarea progresivă a tehnicii, s-au construit diferite tipuri de microscopie, toate avînd drept scop cunoașterea din ce în ce mai exactă a structurii materiei vii.

Vom enumera doar cîteva din aceste tipuri: *microscopul cu fond clar* (fotonic), *microscopul cu fond negru* (cîmp întunecat), *microscopul cu fluorescență*, *microscopul cu contrast de fază*, *microscopul cu raze ultraviolete*, *microscopul electronic*, *microscopul cu televiziune* ș.a.

Microscopul cu fond clar (fotonic, optic) este un instrument optic care permite mărirea obiectelor sau structurilor foarte mici supuse examinării, invizibile cu ochiul liber. El formează o imagine mărită a obiectului, datorită unei combinații de lentile, care funcționează ca o singură lentilă.

Lentilele sînt instrumente optice care produc convergența sau divergența razelor luminoase. Ele sînt confecționate din sticlă și sînt limitate de două supra-

fețe curbe (concave sau convexe), sau de o suprafață plană și una curbă.

Razele luminoase, trecînd printr-o lentilă, deviază de la direcția lor, adică se refractă. Refracția are loc datorită densității mediului pe care-l traversează.

În raport cu acțiunea lor asupra razelor luminoase, lentilele cu suprafețele convexe sînt *convergente*, iar imaginile date sînt *reale* și apar în partea opusă obiectului. Lentilele *concave* sînt *divergente*, iar imaginea pe care o dau este *virtuală*.

Microscopul este format din două părți mari : o parte mecanică și o parte optică, alcătuită din sistemul de iluminare și sistemul optic propriu-zis (obiectivele și ocularele).

1.1.1. PARTEA MECANICĂ A MICROSCOPULUI

Aceasta este formată din următoarele piese : piciorul, platina (masa) și tubul microscopului.

Piciorul microscopului este confecționat din metal și are forma unei potcoave, a cărei parte de mijloc susține un suport (tijă) metalic, pe care se găsesc fixate celelalte părți ale aparatului.

Platina (masa) microscopului servește la susținerea preparatelor microscopice. Ea este prevăzută în centru cu un orificiu (circular sau alungit) prin care pătrund fasciculele luminoase reflectate de oglinda microscopului care trec apoi, fie direct fie prin intermediul unui *condensor*, la sistemul de lentile ale microscopului. Platina variază ca formă ; ea poate fi rotundă, dreptunghiulară sau pătrată.

Fixarea preparatului se face cu ajutorul a două lame flexibile numite *cleme* sau *cavaleri*, care sînt prinse cu un capăt într-un lăcaș din masa microscopului. Pe aceasta se găsesc două verniere mici, rigle metalice

gradate pe o lungime de 9 mm. Acești 9 mm sînt divizați în 10 părți egale, fiecare parte corespunde la $\frac{9}{10}$ dintr-un mm. Diferența dintre lungimile unei diviziuni milimetrice și unele diviziuni de pe vernier este deci de $\frac{1}{10}$ mm. Acest sistem ajută la o analiză metodică și completă a preparatului și permite reperearea părților mai interesante din preparatul examinat.

Tubul microscopului este un element important al microscopului, care susține partea optică propriu-zisă, adică ocularele și obiectivele. El este format din doi cilindri concentrici și se poate mișca pe verticală. În partea inferioară a tubului se află o piesă mobilă numită *revolver*, care poartă obiectivele.

Pentru a putea cerceta un preparat biologic, tubul microscopului se deplasează pe verticală, cu ajutorul a două vize, *macrometrică* și *micrometrică*, pînă cînd acesta se vede clar.

Viza macrometrică este o piesă metalică rotundă, zimțată pe margini, care permite, prin răsucire, urcarea și coborîrea rapidă a tubului microscopului. Se folosește la observarea preparatului cu obiectivele care au o putere de mărire mică.

Viza micrometrică se folosește pentru mișcările mai fine și pentru punerea la punct mai precisă, în cazul utilizării obiectivelor cu o putere de mărire mare. Poziția pe care o au cele două vize pe stativ diferă după tipul microscopului.

Revolverul este un accesoriu important al tubului microscopului care permite schimbarea rapidă a obiectivelor cerute de examinarea preparatului. Revolverul este format din două calote sferice concentrice, suprapuse foarte exact una pe alta. Calota inferioară poartă o serie de orificii (2—4) cu filet, în care se înșurubează obiectivele.

Calota superioară este fixată de capătul inferior al tubului microscopului pe care se rotește calota inferioară. Schimbarea obiectivelor se face printr-o simplă mișcare de rotație a calotei inferioare. Aducerea unui obiectiv în axul tubului microscopului se realizează cu ajutorul dispozitivului cu arc sau a arcului cu tăiș de pe calota inferioară care se oprește, cu un mic clinchet, în lăcașul de pe calota superioară a revolverului.

Condensorul, alcătuit dintr-un sistem de lentile, este fixat sub platina microscopului. Rolul lui este de a concentra razele de lumină reflectate de oglinda fixată sub el. Oglinda se poate mișca în diferite poziții, pentru captarea luminii în raport cu intensitatea sursei luminoase.

Condensorul este prevăzut la partea inferioară cu o diafragmă-iris formată din mai multe lame de oțel subțiri. Diafragma-iris este fixată într-o piesă metalică și se poate mări sau micșora datorită unei mici manete, reglând astfel fasciculul de lumină care trece prin condensor. În sfârșit, condensorul mai este prevăzut cu un sistem de lentile, care refractă razele luminoase, reflectate de oglindă, în așa fel încât acestea converg spre obiectul de observat sub forma unui con larg. Focarul condensorului se găsește în vecinătatea obiectului de observat.

Maximum de claritate se obține când obiectul se găsește exact în focar. Pentru a realiza acest lucru este necesară deplasarea condensorului în sens vertical. Acest lucru se realizează cu ajutorul unui șurub care ridică și coboară condensorul pînă cînd preparatul se vede clar. Folosind un obiectiv cu apertură numerică mare și o diafragmă-iris parțial închisă, se obține o claritate mai bună a imaginii.

1.1.2. PARTEA OPTICĂ A MICROSCOPULUI

Obiectivele sînt sisteme optice convergente, formate din mai multe lentile, cu care se obține o imagine reală mărită și răsturnată a obiectului. Această imagine este observată prin intermediul ocularului situat în partea superioară a tubului microscopului. La acest nivel, imaginea este preluată, mărită și transformată în imagine virtuală.

Există două categorii de obiective: *acromatice* și *apocromatice*. În cadrul acestor două categorii se disting obiective *uscate* și obiective cu *imersie*.

Obiectivele *uscate* și cu *imersie* diferă prin natura mediului interpus între lentila frontală a obiectivului și lama cu preparatul de analizat. În cazul obiectivelor *uscate*, acest mediu este aerul, al cărui indice de refracție ($n=1$) este foarte diferit de cel al sticlei ($n=1,5$).

În cazul obiectivelor cu *imersie*, mediul care separă lentila frontală de preparat este un lichid al cărui indice de refracție este egal sau în jurul celui al sticlei. Cu obiectivele *uscate* se lucrează la o oarecare distanță față de lamă; ele au putere de mărire slabă. Obiectivele cu *imersie* au putere de mărire maximă și în cazul acestora spațiul dintre lentila frontală a obiectivului și lamă este foarte mic.

Folosind un obiectiv cu *imersie*, razele de lumină nu se mai refractă ca în cazul obiectivelor *uscate*, ci își urmează drumul lor normal, intrînd în totalitatea lor în obiectiv.

Lichidele de *imersie* pot fi diferite: apă distilată ($n=1,33$), ulei de cedru, al cărui indice de refracție este aproape identic cu cel al sticlei ($n=1,515$).

În lipsa uleiului de cedru, se poate folosi ulei de parafină cu indice de refracție care nu depășește 1,47.

Jensen (1921) a propus ca lichid de imersie uleiul de parafină, la care se adaugă bromonaftalină, a cărui indice de refracție este de 1,656. Acest lichid se obține folosind 24 părți de bromonaftalină la 76 părți de ulei de parafină.

Curtade (1917) recomandă un amestec de două părți de glicerină pură la 30°, la o parte de apă distilată. Alții recomandă uleiul de ricin medicinal, care dă rezultate satisfăcătoare.

Obiectivele cu imersie se recomandă pentru un grosiment mai mare de 500 x.

Obiectivele poartă cifre care ne indică distanța focală 1/12, 1/15 etc.; 16, 8, 1,5 mm sau grosimentul parțial al obiectivului. Obiectivul unui microscop trebuie să aibă o apertură numerică mare, pentru a avea o mare putere de separare și o mare claritate. Apertura numerică mare presupune și mari aberații de sfericitate (imaginea unui punct apare ca un cerc) și cromatice (imaginea prezintă mai multe culori care nu există în preparat). Pentru a evita aceste defecte se folosesc obiective apocromatice și acromatice.

1.1.3. ABERAȚIA SFERICĂ ȘI CROMATICĂ

Din cele relatate pînă acum reiese că cea mai importantă parte a microscopului o constituie *obiectivele*. Acestea trebuie să aibă: *putere de claritate* (marginile cîmpului bine accentuate și incolore), *putere de analiză* (separare), *putere de pătrundere* (profundime).

Aceste calități ale obiectivelor sînt influențate de aberația sferică și cromatică.

Aberația sferică este determinată de refracția inegală a luminii de către lentilă: mai mult la periferie decît în partea ei centrală. Lentilele cu astfel de defect dau imagini deformate.

Aberația cromatică este determinată de faptul că razele luminoase refractate de lentilă se descompun în culorile lor componente, formînd un spectru. Lentilele respective dau imagini neclare și colorate.

Pentru remedierea celor două defecte s-au construit obiective speciale, acromatice și apocromatice.

Obiectivele acromatice sînt confecționate din numeroase lentile aplanate, la construcția cărora se folosesc sticle speciale din fosfo- și borosilicați. Se utilizează lentile convexe, convergente, cu putere mică de dispersie și lentile concave, divergente, cu mare putere de dispersie. Este corectată aberația cromatică pentru două lungimi de undă.

Obiectivele apocromatice sînt alcătuite dintr-un număr mai mare de lentile (adesea din 12 lentile), la fabricarea cărora se utilizează fluorura de calciu, care conferă lentilelor o mare transparență, putere mare de rezoluție, dînd o corecție aproape completă aberației cromatice pentru 3 lungimi de undă.

Ocularele sînt alte componente din partea optică a microscopului. Un ocular este format din două lentile planconvexe cu fețele plane îndreptate în sus. El servește la preluarea imaginii reale și inversate, furnizată de obiectiv, pe care o transformă într-o imagine virtuală, întotdeauna răsturnată și mărită. Lentila superioară se numește *lentilă ocular*; cea inferioară se numește *lentilă de cîmp* sau *colectoare*.

Fiecare microscop are în trusa lui mai multe oculare. După puterea lor de mărire, ocularele se notează cu cifrele : 5 x, 7 x, 10 x, 15 x etc.

Cele mai mult folosite sînt ocularele 7 x și 10 x. Pentru măsurarea dimensiunilor organelor celulare și a celulelor se folosesc oculare speciale numite *micrometrice*.

Atît cifrele de pe obiective cît și cele de pe oculare ne ajută în determinarea grosimentului total al microscopului. Astfel, dacă notăm cu G grosimentul total, cu g grosimentul obiectivului și g' grosimentul ocularului, atunci $G = gg'$.

Se cunosc mai multe tipuri de oculare: *pozitive*, *negative*, *compensatoare*.

Ocularul pozitiv (numit și ocularul Ramsden) se compune din două lentile L_1 și L_2 , imaginea lor se formează înaintea lentilei 1, din care motiv acest ocular se poate folosi și ca lupă.

Ocularul negativ se compune, de asemenea, din două lentile. Spre deosebire de precedentul, imaginea dată de acest tip de ocular se formează între cele două lentile. Pentru ca aberațiile să fie reduse, cele două lentile sînt planconvexe. Avantajul ocularului negativ este că mărește cîmpul vederii, dar nu se poate folosi ca lupă.

În cazul obiectivelor apocromatice, imaginea albăstră este mare. Diferența cromatică se compensează cu ajutorul *ocularelor compensatoare*. Aceste tipuri de oculare sînt de două feluri:

— *s l a b e*, a căror putere este de cel mult 25 de dioptrii și au lentila cîmpului acromatizată;

— *t a r i*, cu puterea cuprinsă între 30 și 75 de dioptrii, avînd lentila cîmpului formată din trei lentile lipite.

La folosirea ocularelor trebuie avută în vedere apertura numerică a obiectivului, pentru a obține o imagine clară. Astfel, la un microscop binocular, unde există o prismă de dirijare a luminii ce amplifică imaginea, se recomandă folosirea unor oculare care măresc de 6 x, 8 x; ocularele 10 x, 15 x dau imagini neclare, datorită aperturii numerice mici, comparativ cu mărirea dată de oculare.

1.1.4. APERTURA NUMERICĂ (A.N.)

Puterea de rezolvare a unui obiectiv crește proporțional cu sinusul jumătății unghiului de incidență și cu indicele de refracție a mediului extern dintre lentila frontală a obiectivului și preparat. Capacitatea de separare a obiectivului depinde de apertura numerică a acestuia și de lungimea de undă a luminii.

Apertura numerică a obiectivului se determină după formula $A.N. = n \cdot \sin \alpha$

unde : n este indicele de refracție al mediului dintre lentila frontală a obiectivului și lamelă ;

$\sin \alpha$ este semiunghiul format de razele extreme care pătrund în obiectiv.

Apertura numerică este direct proporțională cu $\sin \alpha$. Cele mai bune obiective *uscate* au A.N. de 0,94—0,95. Obiectivele cu imersie au A.N. mai mare decât cele *uscate*, deoarece lentilele de imersie au indicele de refracție (n) mai mare decât 1 (cît are aerul). De exemplu ; apa are $n=1,33$, uleiul de cedru, 1,515. Cea mai mare apertură la obiectivele cu imersie este de 1,4. Apertura numerică a obiectivelor este indicată pe corpul fiecărui obiectiv.

1.1.5. PUTEREA DE REZOLUȚIE (DE SEPARARE)

Prin puterea de rezoluție sau de separare a unui microscop se înțelege distanța cea mai mică la care două puncte sau linii separate pot fi văzute individualizat, adică pot forma imagini clare pentru observator. Distanța dintre cele două puncte sau linii, atunci cînd ele sînt clar vizibile pentru cercetător, poartă numele de *distanță separatoare*.

Această distanță (d) sau *puterea de rezoluție* nu este altceva decât raportul dintre lungimea de undă a

fascicului luminos folosit la iluminarea preparatului (λ) și produsul dintre indicele de refracție al imersiei (n) și semiunghiul format de razele extreme, care pătrund în obiectiv, adică prin apertura obiectivului (α) :

$$d = \frac{0,612 \lambda}{n \sin \alpha}$$

Cu alte cuvinte, obiectivul poate distinge o structură fină, dacă apertura lui numerică este mare, iar lungimea de undă mică.

La lungimea de undă a luminii albe de 5 600 Å (0,56 μ), cel mai mic detaliu de structură care poate fi individualizat cu obiectivul 40 (apertura numerică

0,65), fără imersie, este de $\frac{0,56}{0,65} = 0,61 \mu$. Pentru re-

zolvarea unei structuri mai fine se folosesc obiective cu apertura numerică mai mare, cum este obiectivul 90, cu apertura numerică 1,25, cu ulei de imersie. În această combinație, puterea de rezolvare este $\frac{0,56}{1,25} = 0,18 \mu$. În acest caz, chiar cu un ocular slab poate să fie rezolvată o structură fină.

Puterea maximă de rezoluție a microscopului optic este de 2 430 Å (24 μ m), rezultă în introducerea în formula de mai sus a cifrelor :

$$\frac{0,612 \times 5\,600,}{1,5 \times 0,94}$$

în care :

0,612 reprezintă corecția difracției undelor luminoase ;

5 600 — lungimea de undă a luminii în Å ;

1,5 — indicele de refracție al uleiului de cedru ;

0,94 — semiunghiul aperturii obiectivului.

Folosirea radiațiilor ultraviolete și a lentilelor de cuarț a mărit puterea de rezoluție a ultramicroscopelor până la 1 000 Å.

Ochiul normal, la distanța de 250 mm poate separa două puncte sau linii de 0,08 mm distanță între ele. Prin urmare, puterea de separare a ochiului este de 0,08 mm.

1.1.6. MODUL DE FORMARE A IMAGINII

Obiectivul microscopului dă în partea superioară a tubului microscopului o imagine a obiectului reală, răsturnată și mărită. Această imagine este preluată de ocular și transformată într-o imagine virtuală dreaptă și mărită. Imaginea finală pe care o dă microscopul fonic este virtuală, răsturnată și mult mărită față de obiectul expus examinării.

1.1.7. DETERMINAREA PUTERII DE MĂRIRE A MICROSCOPULUI

Mărirea totală a imaginii depinde de lungimea focală a obiectivului, de puterea de mărire a ocularului, precum și de lungimea optică a tubului microscopului (160 mm); practic, ea este egală cu produsul dintre puterea de mărire parțială a obiectivului și cea a ocularului. Așa, de exemplu, dacă folosim un obiectiv 40 și un ocular 10 x, mărirea totală a imaginii este egală cu produsul dintre mărirea parțială a obiectivului și cea a ocularului. În cazul nostru, 400 x. Pentru obiectivul 40 și ocularul 15 x, mărirea totală este egală cu $40 \times 15 = 600$ x.

Nu se recomandă folosirea de oculare cu mărire foarte puternică, deoarece acestea au rolul numai de

a face observabilă mărirea imaginii dată de obiectiv și nu de a o mări.

La microscopalele fotonice, cele mai bune, se poate ajunge la o mărirea maximă, de obicei de 1350 x, obținută prin combinarea obiectivului 90 cu ocular 15 x.

1.1.8. GROSISMENTUL MICROSCOPULUI

Grosismetul se exprimă prin raportul dintre diametrul obiectului și diametrul imaginii microscopice la distanța minimă a vederii distincte de 250 mm. Grosismetul depinde de distanța la care este văzută imaginea virtuală dată de microscop. Dacă imaginea este apreciată la nivelul ocularului, ea este mult mai mică decît aceeași imagine proiectată pe un plan. Este necesară o subliniere și anume: grosismetul depinde de vederea observatorului, pe cînd puterea depinde numai de elementele geometrice ale microscopului.

Adesea, grosismetul se determină grosso modo, înmulțind grosismetele parțiale ale garniturii ocular-obiectiv cu care se lucrează.

Determinarea corectă a grosismetului se face fie cu ajutorul camerei clare, fie cu cel al micrometrelelor ocular și obiectiv.

1.1.8.1. DETERMINAREA GROSISMENTULUI CU AJUTORUL CAMEREI CLARE

Se desenează la camera clară, la distanța de 25 cm, mai multe diviziuni ale micrometrului obiectiv. Apoi, se măsoară distanța dintre două diviziuni desenate, cu ajutorul unei linii gradate în milimetri. Raportul dintre cifra astfel obținută și distanța reală indică grosismetul.

În cazul cînd distanța dintre diviziunile micrometrului obiectiv nu este acoperită de un număr întreg de milimetri, se va măsura un număr mai mare de distanțe, pînă cînd acestea se vor încadra într-un număr întreg de milimetri. În fine, printr-o regulă de trei simple, se va afla distanța exactă dintre două diviziuni. Să presupunem că 5 diviziuni ale micrometrului obiectiv desenate corespund exact la 16 mm; o diviziune va măsura 3,2 mm, iar grosimentul va fi 320 x.

$$\begin{array}{rcl} 5 \text{ diviziuni} & \dots\dots\dots & 16 \text{ mm} \\ 1 \text{ diviziuni} & \dots\dots\dots & x \end{array}$$

$$x = \frac{16}{5} = 3,2 \text{ mm};$$

cifra obținută (3,2 mm) se înmulțește cu 100, deoarece diviziunile reprezintă sutimi de milimetri. Dacă intervalul dintre două diviziuni de pe desen este de 3 mm, atunci grosimentul sistemului optic va fi:

$$3 \frac{1}{100} \text{ sau } \frac{3 \times 100}{1} = \frac{300}{1} = 300 \text{ x (fig. 1).}$$

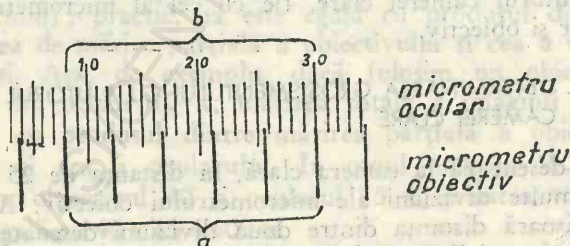


Fig. 1 — Calcularea indicelui micrometric cu ajutorul micrometrului ocular și obiectiv (după Braune)

1.1.8.2. DETERMINAREA GROSISMENTULUI CU AJUTORUL MICROMETRULUI OCULAR

Se utilizează micrometrul ocular și obiectiv pentru a calcula câte diviziuni ale micrometrului ocular sînt acoperite de o diviziune a micrometrului obiectiv. Dacă intervalul dintre două diviziuni ale micrometrului ocular obișnuit reprezintă 0,1 mm, este suficient să înmulțim cu 100 numărul de diviziuni acoperite de o diviziune a micrometrului obiectiv, pentru a afla grosismentul sistemului optic respectiv. Acest procedeu nu se recomandă, deoarece trebuie folosite două scări ale micrometrului ocular și obiectiv; rezultatul obținut este aproximativ, pentru că este greu a evalua o fracțiune a diviziunii micrometrului ocular.

1.1.9. SISTEMUL DE ILUMINARE

Iluminarea preparatului are o mare importanță în obținerea unei clarități cît mai bune a imaginii preparatului. Pentru microscopul fotonic, se folosesc razele luminoase sau electrice cu o lungime de undă de 4 000—8 000 Å. Reglarea luminii la un microscop se face cu ajutorul unei oglinzi plan-convexe, a condensorului și a filtrelor de lumină. La microscopale moderne, sistemul de iluminare se află într-un orificiu în talpa microscopului și este prevăzut cu un sistem special de controlare a fluxului de lumină. Cu ajutorul acestui sistem (pancratic), apertura condensorului poate fi modificată în raport de cerințele de iluminare ale obiectelor. Deasupra sistemului pancratic se găsesc 3 condensoare, care se folosesc după necesități.

Oglinda plan concavă are rolul de a capta lumina naturală sau artificială și de a o trimite în lentilele condensorului sub forma unui con luminos și întot-

de-auna ea este situată sub condensor ; suprafața plană se folosește cu obiectivele 6, 10, 20, atunci cînd sursa de lumină este îndepărtată și puternică. Suprafața concavă a oglinzii se folosește cu obiectivele, puternice, mai ales cînd sursa luminoasă este apropiată și slabă.

Filtrele de lumină au rolul de a întări detaliile imaginii structurii pe care o analizăm.

1.1.10. ACCESORIILE MICROSCOPULUI

Indiferent de tipul de microscop, acesta prezintă numeroase accesorii.

1.1.10.1 CAMERA CLARĂ

Constă dintr-un dispozitiv ce permite suprapunerea a două imagini, văzute prin microscop și cu ochiul liber : imaginea preparatului microscopic pe care voim s-o desenăm și imaginea vârfului creionului de pe hîrtie. Camera clară se folosește pentru a desena pe o foaie de hîrtie imaginea unei structuri sau a unei celule, dată de microscop. De aceea trebuie să urmărim cu creionul imaginea proiectată pe hîrtie și vom obține un desen exact al structurii pe care o analizăm. În principiu, camera clară se compune din două prisme P_1 și P_2 , fixate într-o montură specială pe ocularul microscopului. Sub lentila P_2 se mai găsește o altă prismă P_3 care, împreună cu P_2 formează un sistem echivalent cu o lamă, cu fețele paralele. În ochiul observatorului pătrund razele care vin din microscop, precum și razele care vin de la suprafața foi de hîrtie. Ochiul cercetătorului va vedea în final, suprapuse, imaginea preparatului analizat și a desenului acestuia.

Pentru a determina mărirea se privește prin microscop un micrometru, căruia îi cunoaștem distanța între diviziuni. Pe hîrtie vom desena această distanță mărită și pe urmă vom măsura cu un dubludecimetru.

Cele mai întrebuintate camere clare sînt: camera clară a lui Nachet și camera clară sistem Abbé construite de diferite firme.

Camera clară Nachet este formată dintr-o prismă rombică, la care este lipită lateral o mică prismă triunghiulară în unghi drept. Aceste două prisme sînt închise într-o montură metalică. Acest sistem de prisme se fixează pe tubul ocularului prin intermediul unui inel.

Camera clară Abbé este alcătuită dintr-o oglindă plană fixată la extremitatea unui braț orizontal lung de 10 cm și dintr-un sistem de două prisme ce alcătuiesc un mic cub (cubul Abbé). Cubul se fixează cu ajutorul unui inel deasupra ocularului microscopului. Oglinda se poate înclina în jurul axei sale în raport cu planul orizontal.

Pentru a face un desen exact, în cazul folosirii celor două tipuri de camere descrise, sînt necesare următoarele:

1. O iluminare uniformă a imaginii din preparat și a imaginii pe hîrtie și a creionului.

2. Camera clară să fie centrată cît mai exact, în așa fel încît orificiul prin care trec razele luminoase provenite de pe suprafața desenului (pe hîrtie) să coincidă cu razele luminoase provenite din microscop (centrul optic al microscopului).

3. Pentru a se evita deformarea imaginii, în cazul folosirii camerei clare Abbé, trebuie să dăm oglinzii o înclinare de 45° .

4. Este necesară construirea unor suporturi înclinate pentru fixarea hîrtiei în timpul executării desenului.

În cazul că se efectuează desenul pe masa de lucru, prisma se va înclina astfel încît cîmpul din microscop desenat pe hîrtie să formeze un cerc perfect.

1.1.10.2. REȚEAUA OCULARĂ DE DESENAT, NUMĂRAT ȘI MĂSURAT

Reprezintă o aplicație a metodei cadrilajului folosit de desenatori. Rețeaua oculară este o lamelă (placă) rotundă de sticlă, pe care este gravat un cadrilaj la care pătrățelele au latura de 1 mm.

Această placă se introduce, ca și micrometrul ocular, în tubul ocularului microscopului, cu fața gravată în jos. Pentru a desena este suficient să luăm o bucată de hîrtie împărțită în pătrățele la o scară oarecare și de reprodus în fiecare pătrățel, ceea ce vedem în pătrățelul corespunzător al rețelei din ocular.

La analiza unui preparat microscopic avem nevoie în cele din urmă să știm de cîte ori desenul efectuat a fost mărit, sau ce dimensiuni au diferiții componenți ai celulei sau ai organitului analizat. Pentru aceasta se fac măsurători în plan orizontal. Aceste măsurători nu se fac direct prin suprapunerea unei rigle gradate pe obiectivul de măsurat, ci prin intermediul unor instrumente optice speciale: micrometrul obiectiv și ocular.

1.1.10.3. MICROMETRUL OBIECTIV

Este etalonul tip ce stă la baza măsurătorilor microscopice, reprezentat printr-o lamă de sticlă pe care este gravată la mijloc o scară lungă de 1 mm, divizată în 100 părți egale. Este cunoscut faptul că unitatea de măsură în micrografie este *micronul* (1μ) (0,001 mm); intervalul care separă două diviziuni gravate pe lama

de sticlă este egală cu $1/100$ mm ($0,01$ mm) sau 10 microni (10μ). Pentru a ușura numărarea diviziunilor de pe lamă, 10 diviziuni sînt delimitate prin linii lungi, iar un interval dintre 2 linii lungi este împărțit în 2 printr-o linie mai scurtă, astfel încît între o linie lungă și una mai scurtă se află 5 subdiviziuni marcate prin linii și mai scurte (adică $0,05$ mm = 50μ).

1.1.10.4. MICROMETRUL OCULAR

Are forma unui disc de mărimea tubului ocular în care se introduce cînd lucrăm. Este confecționat din sticlă și pe el este gravată o scară gradată lungă de 1 cm, împărțită în 100 părți egale. Fiecare diviziune în acest caz este egală cu $1/10$ dintr-un milimetru ($0,1$ mm = 100μ). Liniile gravate pe micrometrul ocular sînt la fel ca și la micrometrul obiectiv, pentru ușurarea numărării lor.

Înainte de a se trece la măsurarea elementelor preparatului microscopic trebuie să cunoaștem precis, pentru fiecare ocular și obiectiv de la microscopul cu care lucrăm, valoarea în microni a unei diviziuni de pe micrometrul ocular, adică să știm care este indicele (coeficientul) micrometric. Pentru aceasta ne fixăm asupra obiectivului și ocularului cu care vom lucra. Așezăm micrometrul ocular în tubul ocularului și micrometrul obiectiv pe platina microscopului. Potrivim ca diviziunile scării micrometrului ocular să se suprapună exact pe diviziunile scării micrometrului obiectiv.

Pentru calcularea coeficientului micrometric ne folosim de formula :

$$\frac{n_{ob} \times 10}{n_{oc}}$$

în care :

n_{ob} este numărul de diviziuni ale micrometrului obiectiv care se suprapun exact peste un anumit număr de diviziuni ale micrometrului ocular ;

n_{oc} — numărul de diviziuni ale micrometrului ocular care s-au suprapus exact peste un anumit număr de diviziuni ale micrometrului obiectiv.

Astfel, dacă 5 diviziuni ale micrometrului obiectiv acoperă exact 10 diviziuni ale micrometrului ocular, coeficientul micrometric va fi :

$$\frac{5 \times 10}{10} = \frac{50}{10} = 5 \mu$$

Pentru obținerea acestuia deci, împărțim cifra micrometrului obiectiv la aceea a micrometrului ocular.

Coeficientul micrometric se calculează pentru fiecare combinație de ocular și obiectiv.

Iată câteva exemple calculate la microscopul Zeiss :

obiectiv 8 ; ocular 10 x

— 20 diviziuni ale micrometrului obiectiv sînt acoperite exact de 11 diviziuni ale micrometrului ocular;

coeficientul micrometric este $\frac{20 \times 10}{11} = 18,18 \mu$;

obiectiv 40 ; ocular 10 x

— 5 diviziuni obiective = 14 diviziuni oculare ;

coeficientul micrometric = $\frac{5 \times 10}{14} = 3,56 \mu$;

obiectiv 40 ; ocular K 30 x

— 5 diviziuni obiective = 18 diviziuni oculare ;
coeficientul micrometric = $\frac{5 \times 10}{18} = 2,77 \mu$;

obiectiv 40 ; ocular 7 x

— 20 diviziuni obiective = 45 diviziuni oculare ;
coeficientul micrometric = $\frac{20 \times 10}{45} = 4,4 \mu$.

Pentru calcularea exactă a dimensiunilor elementelor celulare pe care le analizăm sau dimensiunile unei celule, procedăm astfel : punem pe platina microscopului preparatul respectiv ; fixăm în câmpul microscopului elementul pe care-l analizăm, apoi îl măsurăm (în lungime sau în lățime dacă este cazul). Numărul de diviziuni care cuprinde exact organitul celular sau celula unui țesut, îl înmulțim cu indicele micrometric. Rezultatul produsului reprezintă dimensiunea celulei sau organitului respectiv, în microni.

Pentru mai mare precizie se face media mai multor măsurători.

Ocularul indicator este un ocular obișnuit, în care se găsește fixat un fir de păr (indicator), cu ajutorul căruia se pot indica părțile componente ale unei structuri microscopice. Dacă ocularul nu este prevăzut cu un astfel de indicator, atunci se lipește pe inelul diafragmă al ocularului (inel inferior al lentilei câmpului) un fir de păr. Extremitatea liberă a părului nu trebuie să atingă centrul câmpului.

1.2. CUM SE FACE UN DESEN LA MICROSCOP

Un desen se realizează cu ajutorul camerei clare, fixată deasupra ocularului. Camera clară redă în același timp imaginile a două obiecte deosebite : a preparatului ce se analizează, a creionului și a hîrtiei pe care se desenează. Hîrtia pe care se desenează se fixează pe un suport înclinat situat în partea dreaptă a microscopului. Suportul se confecționează din placaj, adaptat pentru desenat la microscop cu tub înclinat. Cu creionul bine ascuțit care apare în cîmpul microscopului urmărim conturul elementelor preparatului cu multă atenție, astfel încît vârful creionului să fie în contact direct cu detaliile structurii pe care o desenăm. În felul acesta se obține pe hîrtia de pe planul înclinat un desen fidel cu imaginea din cîmpul microscopului.

1.3. STABILIREA MĂRIRII DESENULUI EXECUTAT LA CAMERA CLARĂ

Pentru a ne da seama de cîte ori este mărit desenul respectiv ne folosim de o cameră clară, de un micrometru ocular și un micrometru obiectiv. Pe o hîrtie așezată la nivelul la care s-a efectuat desenul a cărui mărire vrem să o determinăm, fixăm cîteva intervale ale micrometrului obiectiv, la aceeași combinație de oculare și obiective. Se măsoară cu un dubludecimal intervalele desenate care se împart la mărimea reală. De exemplu, dacă 8 intervale ale micrometrului (1:100) măsoară 32 mm, atunci mărirea desenului este de $32 : 0,08 = 400$ ori.

În felul acesta se poate obține, pentru orice combinație de lentile (ocular și obiectiv), mărirea reală a desenului executat după preparat.

Dăm mai jos măririle pentru mai multe combinații de oculare și obiective :

Microscop Zeiss :

— obiectiv imersie 90 ; ocular K	10 x = 1100 x
— obiectiv imersie 40 ; ocular	30 x = 1280 x
— obiectiv imersie 40 ; ocular	15 x = 550 x
— obiectiv imersie 20 ; ocular K	30 x = 750 x
— obiectiv imersie 20 ; ocular K	20 x = 520 x
— obiectiv imersie 20 ; ocular K	15 x = 390 x

Microscop Meopta :

obiectiv 10 ; ocular orthocromatic	20 x = 245 x
obiectiv 10 ; ocular H	10 x = 120 x
obiectiv 10 ; ocular H	6 x = 73 x
obiectiv 25 ; ocular orthocromatic	20 x = 650 x
obiectiv 25 ; ocular H	10 x = 320 x
obiectiv 25 ; ocular H	6 x = 190 x
obiectiv 45 ; ocular orthocromatic	20 x = 1120 x
obiectiv 45 ; ocular H	10 x = 560 x
obiectiv 45 ; ocular H	10 x = 340 x
obiectiv 100 ; (imersie) ; ocular orthocromatic	20 x = 2400 x
obiectiv 100 ; (imersie) ; ocular H	10 x = 1150 x
obiectiv 100 ; (imersie) ; ocular H	6 x = 700 x

1.4. TIPURI DE MICROSCOAPE. MICROSCOAPE I.O.R.

Industria optică română pune la dispoziția instituțiilor de învățământ și de cercetare științifică microscopice de bună calitate. Tipurile de microscopice fabricate la noi în țară sînt cele menționate mai jos.

1.4.1. MICROSCOPUL DE LABORATOR TIP M.L. 3

Este binocular, cu dispozitiv de iluminat fixat în talpă. Se folosește în cercetările de biologie, pentru examinarea obiectelor transparente. Grosismetul variază de la 7 x la 1350 x. Are oculare 7 x, 10 x, 15 x, obiective acromatice 10, 20, 40, 90 (cu imersie) și corp revolver cu posibilitatea de adaptare a patru obiective.

1.4.2. MICROSCOPUL DE LABORATOR TIP M.I. 3

Este monocular cu talpa simplă. Se utilizează la cercetări de laborator. Poate să realizeze următoarele puteri de mărire: 70 x, 140 x, 280 x, 640 x, 1000 x, 2000 x, 4000 x, 9000 x, 15000 x, 30000 x, 60000 x, 135000 x. Tubul ocularului este înclinat la 45° față de axa optică. Este prevăzut cu un cap revolver, la care se pot monta patru obiective. Masa microscopului se poate deplasa pe două direcții perpendiculare.

Lumina este concentrată asupra obiectului de cercetat cu ajutorul unui condensor ce se poate deplasa în lungul axei optice a microscopului. Are oculare de tip *Huygens* de 7 x, 10 x, 15 x; obiective acromatice de 10 (0,3), 20 (0,3), 40 (0,63), 90 (1,25) cu imersie uleioasă.

1.4.3. MICROSCOPUL ȘCOLAR TIP M.S. 3

Se utilizează în scopuri didactice în laboratoarele școlare, precum și în cercetări medicale zootehnice etc. Microscopul are o putere de mărire de peste 300 x. Este înzestrat cu oculare *tip Huygens* de 7 x, 10 x și 15 x și obiective acromatice de 10 și 20. Grosismetul microscopului este de la 70 x la 300 x.

1.4.4. MICROSCOPUL DE BUZUNAR

Este un aparat ușor la îndemîna naturaliștilor, tehnicienilor etc. Folosirea lui necesită o pregătire minimă. Puterea de mărire este de 40 x, cîmpul liniar ridicat la dimensiunile și greutatea redusă a microscopului fac ca acesta să devină un auxiliar prețios pentru cercetătorii din diferite domenii. Aparatul poate fi purtat în buzunar ca un toc rezervor. Pentru întreținere se sprijină microscopul cu fața sa frontală pe obiectul de cercetat și se îndreaptă tăietura tubului spre sursa de lumină. Se privește prin ocular, se prind cu degetele cele două butoane laterale, se împinge obiectivul înainte sau se trage înapoi pînă cînd se obține o imagine clară.

Dacă se îndreaptă microscopul spre o sursă de lumină suficient de puternică se pot face și observări prin transparență.

În ultimul timp, industria optică română (IOR) a produs diferite microscopae perfecționate față de tipurile prezentate.

1.4.5. MICROSCOPUL CU FOND NEGRU CU CIMP INTUNECAT

La microscopaele folosite în mod curent, particulele care se observă sînt luminate în direcția axei și ele apar întunecate pe un fond luminos. Pentru a putea fi observate, dimensiunea acestor obiecte trebuie să fie cel puțin egală cu $0,2 \mu$. În cazul cînd ele sînt mai mici, nu mai pot fi observate din cauza fenomenelor de difracție.

Microscopul cu fond negru este un microscop cu fond obișnuit, prevăzut cu un dispozitiv special pentru a lumina preparatul lateral, perpendicular pe axă (lumină indirectă).

Pentru aceasta, microscopul cu fond negru folosește un condensor special (cardioid sau paraboloid), care împiedică pătrunderea directă a razelor luminoase în obiectiv; preparatul este luminat numai în lumină oblică.

Fiecare particulă ce interceptează lumina devine o sursă luminoasă și trimite lumina în toate direcțiile. Ca rezultat, materialul de cercetat apare luminat strălucitor pe un fond întunecat. Datorită acestui fapt, obiectele foarte mici și greu de colorat sau puțin refringente devin vizibile.

Pentru o observație bună, în preparat nu trebuie să existe prea multe particule, iar fasciculul luminos să fie îngust. Întrebuințînd lumina solară sau arcul voltaic, putem pune în evidență particule cu dimensiuni de circa 10 μm sau 100 Å.*)

Principiul acestui microscop are la bază fenomenul *Tyndall*: particule foarte fine de pulberi existente în aer, invizibile la lumina directă, din cauza dimensiunilor lor, devin vizibile cu ochiul liber atunci cînd se găsesc în drumul unor raze luminoase care pătrund într-o cameră întunecată printr-un orificiu.

Și în cazul microscopului cu cîmp întunecat, posibilitatea de a observa este limitată, fie de micimea particulei care nu interceptează o cantitate suficientă de lumină pentru a putea impresiona retina, fie de iluminarea insuficientă. De fapt, diametrul aparent al particulelor nu este mărit; el poate fi considerat nul, însă ceea ce se mărește este intervalul dintre particule.

Pentru a putea lucra cu acest microscop este necesar să se respecte următoarele recomandări:

— lama și lamela folosite să fie degresate și curate;

* Å = 0,0001 μ .

- lama de sticlă să nu aibă o grosime mai mare de 1,0—1,1 mm, pentru a se evita refracția luminii;
- preparatul trebuie să fie foarte subțire (unistratificat), pentru a evita difuzarea luminii;
- să se lucreze cu obiective cu imersie;
- să se folosească o sursă foarte puternică de lumină.

Microscopul cu fond întunecat este de fapt un microscop obișnuit căruia i se înlocuiește condensorul pentru lumină directă, cu condensorul cardioid sau paraboloid care trimite în preparat lumină oblică.

1.4.6. MICROSCOPUL CU CONTRAST DE FAZĂ

Cu cât lungimea de undă folosită ca sursă luminoasă în cercetarea unui preparat este mai mare, cu atât posibilitatea de observare a detaliilor mici este mai limitată. Acest lucru se datorește fenomenelor de difracție.

În anul 1934, fizicianul olandez Zernicke a arătat că în observațiile microscopice contrastul poate fi mărit, modificând modul de iluminare. Fabrica C. Zeiss din Jena a construit primul microscop, pe care l-a numit microscop cu contrast de fază.

Microscopul cu contrast de fază este astfel construit încât realizează o accentuare a diferențelor de fază suferite de razele luminoase ce traversează un preparat. Acest fapt duce la evidențierea clară a celor mai fine structuri. El acționează în mod separat fie asupra razelor care vin direct de la sursă, fie asupra celor care sînt difractate de structura complexă a preparatului.

Față de microscopul optic, cel cu contrast de fază este prevăzut cu un dispozitiv special — *diafragma inelară* — care are rol de a separa fasciculul de raze

directe de cele difractate. Preparatul microscopic analizat reflectă și difractă lumina prin structura lui complexă; fiecare component structural acționează ca sursă de lumină.

Cele două fascicule (directe și difractate) întâlnesc în drumul lor un alt dispozitiv — *placa de fază* — care acționează asupra unuia din fascicule, pe care-l difuzează diferit față de celălalt. În cele din urmă în planul imaginii, diferențele de fază sînt transformate prin fenomene de interferență, în diferențe de intensitate luminoasă perceptibilă vederii. Este adevărat că o parte mică din lumina difractată trece și prin partea mai subțire a plăcii de fază, influențînd puțin imaginea de contrast, dar acest defect este neglijabil. Se pot analiza preparate colorate, care se observă mult mai bine ca de obicei; mai potrivite sînt însă, preparatele slab colorate sau necolorate.

Microscopul cu contrast de fază este de fapt un microscop obișnuit, căruia i se înlocuiesc obiectivele și condensorul, atunci cînd cercetarea solicită analiza materialului în contrast de fază.

1.4.7. MICROSCOPUL CU RAZE ULTRAVIOLETE

Este un microscop fotonic care în loc de unde de lumină albă ($\lambda = 5600\text{\AA}$) folosește raze ultraviolete invizibile, cu lungimea de undă mult mai mică ($\lambda = 2700\text{—}3600\text{\AA}$) și lentile de cuarț. Razele ultraviolete trec prin preparat și sînt înregistrate, nu de retină, fiind invizibile, ci de o placă fotografică.

Folosind raze cu lungimea de undă mai mică decît microscopul fotonic, puterea de rezoluție s-a ridicat pînă la $1000\text{\AA}$. De altfel, această cifră reprezintă limita maximă de rezoluție a microscopiei optice, în general.

Microscopul cu raze ultraviolete are dezavantajul că nu permite analiza directă a preparatelor ci indirectă, prin intermediul fotografiilor.

1.4.8. MICROSCOPUL CU FLUORESCENȚĂ

În tehnicile microscopice descrise, razele vizibile sau invizibile trec prin preparat și sînt recepționate de retina ochiului sau placa fotografică. Microscopul cu fluorescență folosește radiații ultraviolete, cu lungimea de undă mică și cu frecvență înaltă. Aceste radiații invizibile, în contrast cu substanțele fluorescente (luminescente) din preparatele biologice, se transformă în raze fluorescente, care au o lungime de undă mare (pînă la 5 600 Å), dar o energie mică. Prin urmare, razele fluorescente dau o imagine vizibilă și colorată, care poate fi înregistrată de retină sau placa fotografică.

Ca sursă de lumină se folosește lampa cu arc voltaic sau cu vapori de mercur. Razele luminoase pînă ajung la oglindă trec printr-un sistem de filtrare special (colector, iris de cîmp, cuvă cu sulfat de cupru, filtre selective de excitație) și ajung în cele din urmă în preparat, raze cu lungime de undă de 3660 Å.

Această selectare a razelor este realizată și cu ajutorul lentilelor de cuarț ale lămpii și condensorului, precum și de sticla specială din care este confecționată lama portobiect. Mai trebuie menționat faptul că ocularul microscopului este prevăzut cu un filtru special care elimină excesul de lumină și efectul dăunător pentru ochi. În fine, în locul uleiului de cedru fluorescent, se folosește glicerina ca lichid de imersie, lipsită de fluorescență naturală.

Razele ultraviolete trecînd prin preparat produc o luminiscentă vizibilă a structurilor capabile de fluorescență naturală sau artificială.

Unele preparate sînt autofluorescente (clorofila din cloroplaste ș.a.), altele sînt lipsite de fluorescență naturală. Acestea din urmă sînt tratate cu substanțe speciale, *fluorocromi*, pentru a le conferi artificial fluorescență. Fluorocromii sînt adsorbiți selectiv de organele celulare și în contact cu U.V. produc fluorescență. Dintre fluorocromi se utilizează: acridina, primulina, fluoresceina ș.a.

Avantajul principal al acestei tehnici se referă la posibilitatea de a studia anumite structuri „in vivo”. Din acest motiv, microscopia cu fluorescență este utilizată în: citoembriologie, microbiologie ș.a.

1.4.9. MICROSCOPUL ELECTRONIC

Așa cum am văzut, puterea de rezoluție a microscopului optic care folosește la iluminarea preparatului radiații vizibile nu poate depăși limita de $2430 \text{ \AA}$ ($0,24 \text{ }\mu\text{m}$). Singura posibilitate, aceea de a utiliza radiația ultravioletă, cu lungimea de undă mai mică decît cea a spectrului vizibil al luminii, în ultramicroscopul (cu ultraviolete) echipat cu lentile de cuarț, nu a putut depăși $1000 \text{ \AA}$ ca putere de rezoluție.

Granițele invizibilului, pînă la nivel atomic, au fost atinse prin utilizarea radiațiilor X, cu lungimea de undă între $0,06$ și $20 \text{ \AA}$, de aproximativ 5000 de ori mai mică decît a luminii vizibile. Astfel, a luat naștere tehnica de *difracție cu radiații X*, care permite nu numai punerea în evidență a moleculelor și atomilor, ci și aprecierea distanței dintre atomi din diferite lanțuri peptidice. Dar depășirea limitelor invizibilului a avut loc odată cu construirea primelor microscopie electro-

nice. Acestea folosesc, ca sursă luminoasă, fascicule de electroni cu lungimea de undă de la 0,0859 Å (la tensiunea de accelerare de 20 KV) la 0,0028 Å (la 4 000 KV).

După P. G. Ploaie și Zoe Petre (1979), cele mai perfecționate microscopae electronice, aflate în exploatare, au rezoluții garantate de 2—3 Å, în condiții speciale ajungând la 1,2 Å și o putere maximă de mărire de 800 000 de ori.

Asemenea performanțe permit biologului să studieze materia vie la nivel celular, molecular și atomic.

Elementele microscopului electronic. Cele mai moderne microscopae electronice sînt alcătuite din : sistemul electronoptic, sistemul electronic, consola de comandă și sistemul de vid.

Sistemul electronoptic, la rîndul său, este constituit din :

1. *Sistemul de iluminare*, reprezentat de tubul electronic și lentilele condensor. Elementele principale ale tubului electronic sînt, *catodul* și *anodul* ; lentilele condensor sînt de tip electromagnetic.

2. *Camera pentru preparat*, în care se află măsuta pentru preparat, inelul de răcire a preparatului și lampa de iluminare a camerei. La microscopaele moderne pot fi instalate în camera pentru preparat, în funcție de tipul de cercetare : goniometru, dispozitive pentru cercetarea preparatului la temperaturi ridicate sau scăzute, dispozitivul de baleiaj sau cel pentru analize cu raze X.

3. *Sistemul de formare a imaginii* este prevăzut, în funcție de tipul de microscop, cu 3, 4, 6 lentile electromagnetice, alcătuite la rîndul lor din : lentile *obiectiv*, *intermediară* și *proiector*.

4. *Camera de observație* este prevăzută cu 1—3 ferestre. Ea este în legătură cu lentila proiector și cu caseta fotografică.

5. *Camera fotografică* se află sub camera de observație.

Sistemul electronic și consola de comandă cuprinde sistemul de alimentare al circuitelor lentilelor și sistemul de vid. Curentul de alimentare al lentilelor este furnizat de un circuit de 20 KHz. Consola de comandă are forma de birou ; pe ea sînt amplasate comutatoare, potențiometre de control ș.a.

Tipuri de microscop electronice (după P. G. Ploaie și Z. Petre). Indiferent de tipul de microscop construit, la formarea imaginii se folosește o sursă de electroni ca mijloc de iluminare a preparatului, sursă dirijată de un sistem de lentile electromagnetice.

Microscop electronice de transmisie (tip TEM)

M. electronice de baleiaj (tip SEM)

M. e. de transmisie și baleiaj (tip STEM)

M. e. analitice de transmisie (tip TEAM)

M. e. sistemice

M. e. cu fotoemisie (tip PEM)

M. ionice cu emisie de câmp (tip FIM)

Microsonde electronice (EPI)

1.5. LUPA. TIPURI DE LUPE

Cunoscută încă din antichitate și folosită la observarea obiectelor mai mici, lupa reprezintă un instrument indispensabil naturalistului. Lupa se mai numește și *microscop simplu* sau *ocularul lui Kepler* și este formată dintr-o lentilă convergentă. Există și lupe formate din mai multe lentile. Obiectul de analizat la acestea se așază între focar și lentilă, iar imaginea care

se obține este virtuală, nerăsturnată, dreaptă și mărită. Puterea de mărire a unei lupe este egală cu convergența ei. Această înseamnă că o lupă este cu atît mai puternică cu cît distanța ei focală este mai mică. Grosimentul unei lupe este egal cu produsul dintre putere și distanța minimă a vederii distincte. Cu ajutorul unei lupe se pot examina obiecte cu o mărire de pînă la 0,01 mm. Se cunosc :

Lupa lui Coddington, care este formată dintr-o sferă de sticlă ce prezintă o gîtuitură perpendiculară pe axă. Această gîtuitură joacă rol de diafragmă.

Lupa aplanatică este formată din două lentile divergente de flint, între care se găsește o lentilă groasă convergentă de Crown.

Lupa acromatizată este formată dintr-o lentilă convergentă de Crown și una divergentă de flint, folosită mai ales la studiul fotografiilor.

I.O.R. construiește diferite tipuri de lupe : lupa de preparare, lupa pliantă, lupa geologică, lupa cu picior, lupa cu mîner, lupa ceasornicar, lupa Brinell, lupa textilă și lupa filatelică.

1.6. TERMOSTATUL

Este un aparat de o construcție specială, frecvent folosit în laboratoare. Se cunosc numeroase tipuri de termostat, dar în general ele sînt construite după același principiu.

Un termostat are forma unui dulăpior cu pereții dubli, confecționați din metal. Între pereți există un material izolant, azbest, vată de sticlă sau glicerină, care contribuie la menținerea unei temperaturi constante în interiorul termostatului.

Temperatura este reglată automat, datorită unui termoregulator, montat pe termosta. Cu ajutorul unui dispozitiv se fixează temperatura dorită. Cînd aceasta a fost depășită se întrerupe automat legătura cu sursa electrică și se restabilește automat cînd temperatura a scăzut sub cea dorită.

Temperatura din termosta este indicată de un termometru ce are rezervorul de mercur în interiorul termostaului.

În interiorul acestuia se găsesc cîteva rafturi metalice, mobile, care sînt perforate, pentru ca aerul cald să fie uniform răspîndit.

1.7. AUTOCLAVUL

Se compune dintr-un cazan confecționat din tablă groasă, rezistentă la presiune, în care se pune apă. Partea superioară a cazanului este prevăzută cu un capac metalic gros, care se închide cu mai multe șuruburi laterale. Pentru închiderea ermetică a capacului, marginea lui este prevăzută cu o garnitură de cauciuc. Autoclavul se încălzește pînă ce apa se transformă în vapori, la o presiune de cca 2 atmosfere.

Nivelul apei din cazan este indicat de un tub de nivel care comunică cu interiorul acestuia. Tubul de nivel ca și robinetul de scurgere al apei se găsesc la partea inferioară a cazanului.

În partea superioară a cazanului se află un robinet pentru ieșirea aerului și a vaporilor de apă, un manometru (pentru măsurarea presiunii vaporilor) și o supapă de siguranță, care se deschide automat în momentul cînd presiunea vaporilor este prea mare.

Cazanul, împreună cu accesoriile descrise, este protejat la exterior de mantaua autoclavului, confecționată din tablă.

1.8. MICROTOMUL

Este un aparat cu care se efectuează secțiuni fine și uniforme de o anumită grosime, indispensabil în tehnica de microscopie. Există mai multe tipuri de microtom, dar alcătuirea lor este în general asemănătoare.

Un microtom este alcătuit dintr-un corp metalic, la care este atașat un dispozitiv de tăiere care se mișcă fie orizontal, lovind obiectul fixat într-un lăcaș, în poziție verticală, fie obiectul de secționat acționat în sens vertical printr-un dispozitiv, de data aceasta briciul este fix.

Dimensiunea pieselor, finețea de construcție și modul de manevrare, manual sau mecanic, fac să se obțină secțiuni succesive foarte subțiri și de aceeași grosime, care pot fi studiate în bune condiții la microscop.

1.8.1. TIPURI DE MICROTOM

Dintre cele mai simple tipuri este microtomul de mână sau cel al lui Ranvier, format dintr-un cilindru metalic gol, terminat la partea superioară cu o placă netedă (masă), pe care alunecă lama briciului. În interiorul cilindrului se află o tijă care ridică la nivelul plăcii obiectul de secționat singur, în cazul în care el este mare sau așezat în măduva de soc, în cazul în care el este mai mic și mai fragil. De asemenea, în interiorul cilindrului poate fi introdus și un obiect inclus într-o anumită substanță (parafină, celoidină, gumă arabică, aliaje metalice).

Materialul de secționat se fixează cu ajutorul unui dispozitiv reglat de un șurub exterior. Ridicarea obiectului în vederea secționării se face prin mișcări lente cu ajutorul unui șurub micrometric. Secționarea se face cu ajutorul briciului și grosimea secțiunii (10 sau chiar 5 μ) depinde în mare măsură de iscusința cercetătorului. Microtomul de mână descris se manipulează în modul următor: se prinde cu mâna stângă aparatul, astfel încât platforma care depășește diametrul cilindrului să se sprijine pe degetul cel mare și arătător; briciul se prinde cu mâna dreaptă și se mișcă cu latura plată la nivelul platformei. Pentru a avea mișcări uniforme, nesacadate, se cere ca antebrațul și mâna să formeze un ansamblu rigid, astfel încât deplasarea briciului să se poată face uniform prin mișcările brațului. Secțiunile se lasă să cadă într-un cristalizor plin cu apă sau alcool. Fragmentele de soc care se secționează odată cu obiectul se îndepărtează de pe brici cu ajutorul unui ac spatulat.

Microtomul *Lelong* cu acționare semimecanică este alcătuit dintr-un bloc metalic care are la partea superioară două lame de sticlă, peste care alunecă briciul.

Obiectul de secționat se așază între semicilindrii de măduvă de soc și este împins printr-un dispozitiv, puțin deasupra nivelului plăcilor de sticlă peste care alunecă briciul, ce poate fi ținut cu amândouă mâinile, astfel încât se obține mai multă siguranță în efectuarea mișcărilor.

La alte microtoame, perfecționările aduse se referă la modul de acționare al briciului.

Microtomul tip *Minot*. Fabricat și în România, este un microtom automat, destinat obținerii secțiunilor seriate. Este alcătuit din următoarele componente: *stativul*, *portcușitul* și *portobiectul*.

Stativul microtomului, reprezentat de o placă metalică grea, asigură stabilitatea microtomului.

Pe stativ sînt montate *portcuțitul* și *portobiectul*.

Portcuțitul este reprezentat de o piesă metalică glisantă, în care se fixează cuțitul de microtom cu tășul în sus. Piesa face corp comun cu cuțitul, așa încît atunci cînd dorim să apropiem sau să îndepărtăm cuțitul de portobiect, împingem înainte sau tragem înapoi portcuțitul, după slăbirea șurubului care îl fixează. Cuțitul, la rîndul lui, poate fi înclinat la un anumit unghi cu ajutorul unei manete laterale.

Portobiectul este alcătuit din mai multe elemente, toate acționate de o roată cu manivelă.

Portobiectul propriu-zis este reprezentat de o piesă metalică asemănătoare unui cui imens, retezat: fl o a r e a cuiului este un disc cu suprafața brăzdată, pe care se fixează bloculețul cu materialul de secționat; corpul cuiului este o tijă scurtă, cilindrică, cu extremitatea retezată. Înainte de secționare, portobiectul se introduce într-un lăcaș mobil, acționat de o manetă.

Prin manevrarea roții cu manivelă, întreg angrenajul microtomului este pus în mișcare: portobiectul este deplasat spre cuțit (prin mișcări glisante pe verticală) cu un număr de microni, fixat în prealabil pe rozeta micrometrică.

La un moment dat, după mai multe secțiuni, portobiectul nu se mai deplasează spre cuțit, deoarece axul filetat acționat de roata dințată a ajuns la capăt și nu mai poate împinge blocul metalic glisant de care este fixat lăcașul portobiectului. Repunerea microtomului în funcțiune se face astfel: se ridică dispozitivul, numit g h e a r ă m e t a l i c ă, care blochează roata dințată cu mîna stîngă, iar cu mîna dreaptă se învîrtește roata dințată în sens invers, pînă cînd blocul

metalice care glisează pe orizontală este readus lângă roata dințată.

Microtomul glisant (cu șină tip Schanze) este mai rar prin laboratoarele de cercetare.

La acest tip de microtom, portobiectul se ridică datorită unui mecanism alcătuit dintr-o roțiță gradată, o lamă metalică și o manetă, fiecare interval al gradăției corespunde unui micron. Cuțitul care rămîne la același nivel alunecă în lungul unui jgheab, fiind deplasat cu mîna înainte și înapoi. Are dezavantajul că mecanismul de reglare al micronilor nu este cuplat automat cu angrenajul microtomului, așa cum se întâlnește la tipul *Minot* descris.

1.9. USTENSILE DE LABORATOR

1.9.1. BRICIUL

Pentru efectuarea secțiunilor, instrumentul cel mai util și des întrebuințat este briciul, de preferință un brici anatomic cu lama plan-concavă. În lipsa unui astfel de brici se poate folosi unul obișnuit sau o lamă de bărbierit. Briciul trebuie întrebuințat foarte curat, în acest scop se va șterge cu o cârpă moale după fiecare întrebuințare.

Cu ajutorul acestuia se obțin secțiuni suficient de fine pentru a putea fi examinate la microscop; dacă uneori secțiunile nu sînt îndeajuns de clare, aceasta se datorește fie faptului că briciul nu a fost bine ascuțit, fie că secțiunile au fost efectuate oblic sau sînt prea groase. Este necesar ca ascuțirea briciului să se facă cu multă grijă, pentru ca tăișul să nu aibă știrbituri ce ar putea rupe obiectul în timpul secționării. Ascuțirea corectă a briciului se face după o tehnică simplă,

folosindu-se o piatră specială (șist argilos sau piatră de Arkansas), care în prealabil se unge cu un amestec în părți egale de glicerină și alcool de 70% 80% sau glicerină simplă, ulei sau apă de săpun.

Briciul se așază pe lat și se împinge pe piatră cu tăișul înainte pînă la capătul acesteia, după care se întoarce pe muchie și se face aceeași mișcare în sens invers. După ascuțirea pe piatră, această operație se continuă pe o curea netedă, însă mișcarea se face de data aceasta cu muchia înainte. Briciul este bine ascuțit atunci cînd un fir de păr mișcat prin suflare pe tăiș se taie cu ușurință.

Briciul se păstrează într-un toc și se ascute trăgîndu-se pe curea la fiecare trei patru secțiuni executate.

Alte ustensile sînt : acele de preparare, care pot fi confecționate din ace de cusut înfipite cu urechea într-un mîner de lemn ; ace spatulate ; prosoape pentru ștergerea sticlăriei (din material obișnuit) și pentru curățarea acelor, lamelor și lamelelor (din material moale și fin) ; un bisturiu ; pense ; o foarfecă obișnuită ; o lampă de spirt sau bec Bunsen ; un cîntar cu greutate pînă la 1 kg ; o balanță analitică de laborator ; etichete pentru preparate și sticlele cu reactivi ; rechizite de desen ; hîrtie de filtru ; tetine de cauciuc pentru pipete ; mojar ; platină șofantă ; băiță.

Sticlărie. Ca obiecte de sticlă frecvent utilizate în laborator sînt paharele obișnuite de apă, respectiv paharele de laborator ; lame și lamele ; eprubete ; cilindre gradate ; sticlute cu picător (20 picături de apă sau 16 picături de ulei de parafină = 1 ml) ; sticlute pentru reactivi (de culoare brună și cu dop rodat) ; pîlnii de sticlă de diferite dimensiuni ; baghete de sticlă (de circa 15—20 cm lungime) ; baloane ; sticle de ceas ; cutii Petri ; pipete, pahare Borell (fig. 2). Lama de sticlă este de

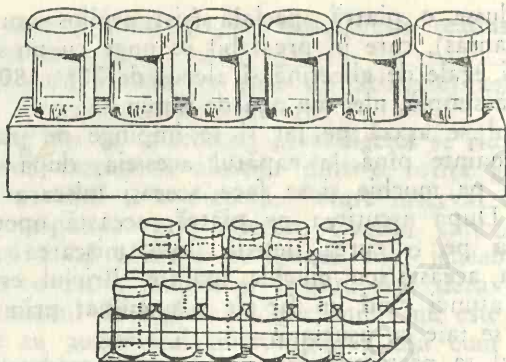


Fig. 2 — Trusa de pahare Borell cu alcool de concentrații diferite

formă dreptunghiulară, avînd de obicei 75/26 mm, iar lamelele, care sînt tot din sticlă sînt de obicei de formă pătrată de dimensiunile 15/15, 18/18 sau 22/22 mm, precum și dreptunghiulare de dimensiuni 24/32, 24/42 mm etc.; se folosesc și lamele circulare, care sînt mai rezistente la spargere. Degresarea lamelor și lamelor se face în mod obișnuit cu alcool de 70% sau cu apă de săpun și se păstrează în vase cu alcool de 90%. Pentru recuperarea lamelor și lamelor, a preparatelor deteriorate, acestea se fierb într-o soluție de carbonat de sodiu, timp de 30 de minute și apoi se pun într-o soluție alcătuită din :

apă	1 000 ml
dicromat de potasiu	100 g
acid sulfuric	100 ml

Acestea se amestecă în ordinea arătată. În acest amestec se țin cîteva zile, apoi se spală de mai multe ori în apă, se șterg bine și se trec într-un vas cu alcool de 90%, din care se scot la nevoie, ștergîndu-se cu o cîrpă moale.

Capitolul II

TEHNICA DE EFECTUARE A SECȚIUNILOR ȘI PREPARATELOR MICROSCOPICE

Secționarea materialelor biologice, în vederea efectuării preparatelor microscopice, se poate face utilizând diferite procedee.

2.1. OBTINEREA SECȚIUNILOR DE MINĂ

Orice material botanic ce urmează a fi studiat la microscop trebuie pregătit în prealabil pentru a putea fi cercetat.

Unele materiale botanice, cum sînt cele de dimensiuni mici, de exemplu algele, iar dintre plantele superioare frunzele foarte subțiri de la *Elodea canadensis* (ciuma apelor), pot fi studiate la microscop fără a fi secționate.

Majoritatea obiectelor vegetale însă trebuie studiate în secțiuni fine, căpătînd astfel transparența necesară examinării la microscopul optic.

Avantajul tuturor metodelor de secționare este în primul rînd menținerea coeziunii dintre celule în cadrul unui țesut, cel puțin în planul de secționare. Apoi, efectuînd secțiuni în diferite planuri ne putem da seama, la analiza secțiunilor, de structura tridimensională sau spațială a țesutului respectiv.

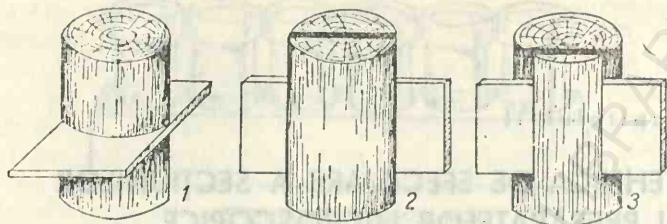


Fig. 3 — Secțiuni fundamentale :

1 — transversală ; 2 — longitudinală ; 3 — tangențială

Secționarea frecvent utilizată este cea *transversală*, dar ea poate fi *longitudinală*, *radiară* (adică paralelă cu raza), *tangențială* (perpendiculară pe rază) (fig. 3). În cazul organelor plane, de exemplu lamina frunzelor, secțiunile se fac paralel sau perpendicular față de suprafața organului. Secțiunile se pot face cu un brici (secțiuni de mînă), (fig. 4), sau cu ajutorul microtomului.

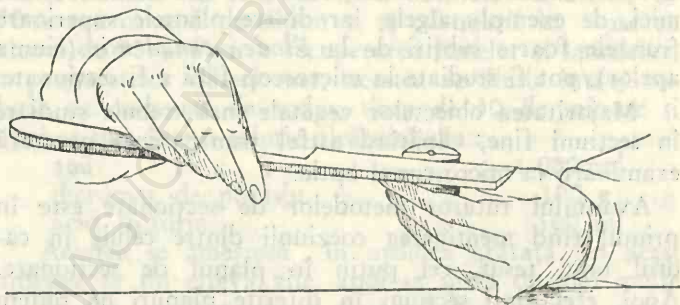


Fig. 4 — Efectuarea secțiunilor transversale cu ajutorul briciului și a măduvei de soc (original)

2.1.1. PREPARAREA MATERIALULUI DE SECȚIONAT

Materialul botanic ca obiect de studiu la microscop poate fi folosit în stare proaspătă, uscat (material de herbar) sau conservat. Întrucît, în unele cazuri, cercetarea se face pe material uscat, dăm în continuare indicații privind pregătirea acestuia, deoarece secționarea propriu-zisă este identică pentru oricare din cele trei feluri de material.

Partea din planta uscată ce urmează a fi studiată se pune mai întâi într-o eprubetă cu alcool de 95%, timp de o oră, pentru îndepărtarea aerului din țesuturi; alcoolul se înlocuiește cu apă distilată și în acesta materialul botanic este lăsat, de asemenea, timp de o oră. Eprubeta cu conținutul său se introduce în apă clocotită, unde se lasă pînă la răcire. Materialul se taie în mai multe bucăți, care se trec apoi într-o soluție amoniacală apoasă (1 : 1) și se încălzește din nou pînă la fierbere. După răcire, materialul se lasă de la 24 ore pînă la 48 ore în soluția amoniacală, apoi aceasta se îndepărtează prin spălare cu apă și materialul astfel tratat se trece treptat prin seria de alcool pînă la concentrația de 90%. După această ultimă operație poate fi secționat cu briciul sau după împarafinare, cu microtomul.

2.1.2. TEHNICA SECȚIONĂRII MANUALE

Efectuarea secțiunilor de mînă este una din metodele principale în tehnica microscopiei botanice, deoarece prin această metodă se poate realiza un mare număr de secțiuni foarte repede și cu un minimum necesar de instrumente. După un oarecare exercițiu, secțiunile pot să fie atît de fine, încît permit și folosirea unor grosisme microscopice mai puternice.

Materialele botanice trebuie să prezinte o consistență potrivită secționării, așa cum sînt unele materiale în stare proaspătă (vie), de exemplu talurile de *Hepaticae*, tulpinile ierboase, frunzele plantelor superioare ș.a. Toate aceste obiecte prezintă în mod natural suficientă rezistență, putînd fi astfel secționate în stare vie.

Secțiuni cu briciul se pot face și prin material fixat. Ca mediu de fixare, cel mai indicat este alcoolul etilic de 70—80% și chiar 95%, sau mult mai bun este amestecul de alcool-formol-acid acetic (AFE). După menținerea obiectelor timp de 24 ore în unul din acești fixatori, obiectele devin suficient de dure pentru a fi secționate cu ușurință.

Dacă unele obiecte după fixare în AFE sînt încă prea moi, se mai lasă 24 de ore în alcool etilic 95%, căpătînd astfel rigiditatea necesară secționării. Dacă dimpotrivă, unele materiale botanice au devenit prea casante după ce au stat în alcool de 95%, ele trebuie ținute cîteva minute în apă de robinet.

Numai relativ puține obiecte vegetale sînt prea dure prin consistența lor, pentru a fi secționate manual. Dacă duritatea lor se datorează încrustării cu calciu sau silice, ele trebuie decalcificate sau desilicificate. Lemnul pierde adesea din duritate dacă este fiert timp de 30 de minute sau chiar mai mult în apă simplă sau în apă cu glicerină sau dacă este ținut un timp mai îndelungat într-o baie de apă fierbinte. Cea mai bună soluție pentru înmuierea lemnului este cea de trietilenglicol, după Burkart. Aceasta constă din trietilenglicol, la care se adaugă o picătură de HCl sau de alt acid mineral, trecînd acest amestec în termostată la 120—130°C. În această soluție de trietilen-glicol fierbinte se introduc fragmentele de lemn, lă-sîndu-le acolo 20 de minute sau chiar mai mult. După

aceasta, bucățile de lemn devin translucide și se pot secționa ușor cu microtomul de mână sau chiar cu o lamă de ras. Trebuie însă stabilită durată optimă de menținere a obiectelor lemnoase în amestecul de trietilen-glicol, deoarece menținerea lor prea mult timp duce la macerarea acestora. Obiectele astfel muiate se pot păstra într-un vas bine închis, în stare uscată, fără a-și pierde proprietățile necesare secționării. Dacă pe bucățile de lemn se află vopsea, aceasta trebuie curățată, întrucât împiedică pătrunderea amestecului menționat și înmuiera.

Efectuarea secțiunilor într-un material botanic, pregătit așa cum s-a arătat mai înainte, este relativ simplă. Obiectul de secționat se ține între degetul mare, arătătorul și degetul mijlociu al mâinii stîngi, iar în cealaltă mână se ține lama de ras. Pentru a evita tremuratul, se așază ușor ambele încheieturi (coate) ale mâinilor pe marginea mesei de lucru.

Obiectul de secționat trebuie să prezinte în primul rînd o suprafață de tăiere netedă și pentru aceasta se secționează cu lama o porțiune subțire de la suprafața obiectului. Dacă suprafața tăiată este plană, se ia o altă lamă nouă care se așază deasupra obiectului, urmărindu-se cu atenție unghiul pe care lama îl face cu suprafața plană. Acest unghi depinde de consistența materialului, fiind mai mic în cazul materialului moale. Lama trebuie orientată perpendicular pe axa obiectului și ea se trage fără presiune pe aceasta, pătrunzînd într-un loc în obiect unde îl taie, obținînd astfel o secțiune.

Întrucît nu fiecare secțiune este bună, se fac mai multe secțiuni care se pun în 1—2 picături de apă pe lamă. Pentru imagini de ansamblu la grosisme mici, secțiunile pot fi mai mari și relativ groase. În

schimb, pentru cunoașterea unor detalii fine sînt necesare secțiuni foarte fine. De pe lamă, secțiunile pot fi luate cu ajutorul unei pense sau mai bine cu o pensulă.

2.1.3. MATERIALE NECESARE SECȚIONĂRII

Multe obiecte se pot secționa în modul simplu descris anterior. Altele însă trebuie fixate într-un material adecvat, care să prezinte aproape aceeași duritate sau chiar mai mare decît obiectul de secționat. De aceea există diferite materiale utilizate pentru fixarea obiectelor ce trebuie secționate.

În mod obișnuit se folosește *măduva de soc*, care se obține numai din lăstarii de un an de la *Sambucus nigra*, ce trebuie colectați la sfîrșitul toamnei sau iarna. Se lasă apoi ramurile respective timp de cîteva săptămîni, pentru a se usca bine și numai după aceea se scoate ușor măduva de soc, prin îndepărtarea țesutului lemnos. Măduva de soc uscată se poate păstra ani de zile.

Pentru obiecte mai dure se utilizează adesea *morcovi cruzi*, dar aceștia prezintă inconvenientul că cromoplasmele portocalii impurifică adesea preparatele microscopice.

La secționarea unor obiecte, cum sînt frunzele aciculare („acele”) de la *Coniferae*, un material foarte bun pentru fixarea acestora îl constituie *pluta*. În acest scop se folosesc dopurile dense de plută, cele poroase fiind inutilizabile.

Săpunul glicerinat reprezintă, de asemenea, un material de fixare excelent pentru obiectele vegetale nu prea tari. Pentru aceasta se taie din săpun mici bucăți paralelipipedice, astfel ca să poată fi ținute ușor între degete. Un asemenea bloculeț se secționează longitudinal, iar în cele două jumătăți se face cîte un șanț corespunzător cu grosimea obiectului de secționat. După fixarea obiectului în săpun, cele două jumătăți se lipesc

cu alcool etilic 50%. Secțiunile odată obținute se introduc în apă în care s-a dizolvat săpunul, spălându-le apoi de mai multe ori cu apă de robinet pentru îndepărtarea urmelor de săpun.

Obiectele vegetale de secționat se pot introduce, de asemenea, în *parafină* în curs de întărire. În acest scop, parafina se toarnă în stare topită într-o „băiță” de porțelan sau într-o cutiuță făcută din hârtie de desen, în care se așază materialul ce urmează a fi secționat. Când parafina cu piesa încorporată s-a întărit complet, se scoate blocul de parafină și se taie în bucăți de mărime potrivită, care apoi se secționează. În funcție de duritatea materialului vegetal, se pot prepara amestecuri de parafină cu puncte de fuziune diferită.

Unele obiecte foarte mici, de exemplu semințele mici, se pot secționa mai ușor prin lipirea lor cu gumă arabică pe o bucată de măduvă de soc care se secționează numai după întărirea gumii arabice. După aceea secțiunile se pun în apă, în care guma arabică se dizolvă.

2.1.4. SECȚIONAREA CU AJUTORUL MĂDUVEI DE SOC

Înainte de a folosi o bucată de măduvă de soc pentru secționare este necesar să verificăm dacă nu prezintă resturi de țesut lemnos sau sclerenchim care strică lama briciului. Din măduva de soc se taie o bucată de lungime egală cu materialul de secționat și această bucată de măduvă se secționează în două jumătăți longitudinale, între care se așază obiectul de secționat. Apoi măduva de soc cu materialul fixat în ea se ține între degetul mare, cel arătător și mijlociu și se face prin măduvă, inclusiv prin obiectiv, o secțiune plană, după care se efectuează succesiv cu briciul sau lama secțiuni transversale sau longitudinale prin materialul de studiu (fig. 3)

Dacă grosimea obiectului vegetal ce trebuie cuprins în măduvă de soc este mare, atunci în cele două jumătăți longitudinale de măduvă se face un șanț longitudinal, pentru secționarea transversală a obiectului sau transversal pentru secționarea longitudinală a obiectului. În ambele cazuri, lărgimea șanțului trebuie să fie corespunzătoare cu grosimea obiectului de secționat care se introduce înăuntru, scobitura făcută avînd rolul de a feri obiectul de strivire.

De obicei, se efectuează mai multe secțiuni care se pun împreună cu secțiunile făcute prin măduva de soc, într-o sticlă de ceas sau un vas Petri cu apă, unde măduva de soc se separă de secțiuni.

În cazul efectuării unor secțiuni longitudinale prin diferite materiale vegetale, mai ales a unor obiecte cilindrice, acestea trebuie așezate fie întregi, fie tăiate în două jumătăți, într-un șanț făcut transversal în jumătățile de măduvă de soc, astfel ca materialul de secționat să poată sta fix în acel șanț. Apoi ținînd între degete măduva de soc cu materialul, se secționează acestea, iar secțiunile obținute se pun tot la fel într-un vas cu apă, de unde se triază cele mai bune secțiuni.

2.1.5. MEDII DE INCLUDERE PENTRU PREPARATE DURABILE (PERMANENTE) ȘI MONTAREA LOR

Analiza la microscop a secțiunilor colorate necesită în prealabil impregnarea lor cu un lichid special, urmată de montarea acestora pe lame de sticlă, numite *lame portobiect*. Lichidul folosit pentru impregnarea materialului vegetal este denumit *mediu de includere*. Acesta nu trebuie să dăuneze obiectelor incluse, ci din contra, să le protejeze împotriva substanțelor nocive și să prezinte un indice de refracție corespunzător cu materialul inclus.

Există medii care se solidifică treptat și altele care rămân fluide, însă cele mai bune pentru preparate durabile sînt primele.

Un mediu utilizat frecvent, dar nu pentru efectuarea preparatelor permanente, ci pentru analiza microscopică imediată a secțiunilor făcute cu briciul, este *apa*. Aceasta este indicată pentru examinarea obiectelor vegetale, deoarece prezintă un indice slab de refracție, care permite o reliefare bună a obiectelor analizate.

Există două categorii de medii: *solubile în apă* și *insolubile în apă*.

2.1.5.1. MEDII DE INCLUDERE SOLUBILE ÎN APĂ

Aceste medii se folosesc de obicei în cazul obiectelor la care deshidratarea ar produce contractarea lor prea puternică, cum sînt de exemplu multe alge.

Mediile hidrosolubile sînt indicate și pentru faptul că lucrîndu-se mai ușor, se pot efectua multe preparate într-un timp scurt.

Totuși multe medii dintre acestea prezintă și o serie de dezavantaje, deoarece nu mențin toate colorațiile efectuate, iar preparatele obținute nu au aceeași durabilitate ca cele incluse în rășini.

Dintre *mediile de includere care rămân fluide* menționăm pe cele mai mult întrebuintate: *glicerina*, *formolul (formalina) cu apă*, *soluția saturată de levuloză*, *lactofenolul Aman*.

Glicerina este un lichid siropos, dulce, higroscopic, solubil în apă, în alcool, în eter și insolubil în benzen, cloroform ș.a. Ea se obține prin fermentația glucozei iar industrial, pornind de la propenă.

Datorită indicelui său de refracție mic (1,47) și chiar mai mic decît al balsamului, glicerina se folosește, cu bune rezultate, ca mediu de includere al secțiunilor.

Ea este un mediu superior în comparație cu apa, datorită vîscozității sale, care permite o aderare mai mare a lamelei de lamă, precum și pentru faptul că se evaporă mai lent, ceea ce contribuie la o păstrare mai îndelungată a preparatelor. Avînd indicele de refracție mai ridicat decît al apei, ea diminuează relieful obiectelor examinate și în plus deshidratează puternic celulele vegetale vii, uneori deformîndu-le, îngreunînd astfel studiul lor la microscop. Un alt inconvenient al folosirii glicerinei este că decolorează secțiunile tratate cu coloranți carminați, hematoxină ș.a. Pentru evitarea acestui neajuns, glicerina se acidulează cu acid formic sau acid acetic 10%.

Glicerina folosită pentru efectuarea preparatelor trebuie să fie pură, iar montarea secțiunilor să se facă într-un mediu fără praf, deoarece acesta impurifică preparatul și împiedică astfel analiza microscopică. Ca mediu de montare a secțiunilor, glicerina se folosește de obicei în soluție apoasă după următoarea rețetă :

glicerină pură	3 părți
apă distilată	1 parte

După colorarea secțiunilor cu diverși coloranți corespunzător cu scopul urmărit, acestea se spală cu apă distilată sau de robinet. Apoi, cu ajutorul unei pense sau al unui ac spatulat, se așază pe lama port-obiect, se pun deasupra lor 2—3 picături de glicerină, după care se acoperă cu lamela. Pentru păstrarea mai îndelungată a acestor preparate, trebuie să fie lutate (vezi pag. 73).

Formol (formalina) cu apă. Acest mediu se pretează cel mai bine la includerea unor alge fine, al căror tal se contractă foarte ușor. De asemenea, în acest mediu

culorile naturale se păstrează cîtva timp dacă preparatele se țin la întuneric.

Pentru includere, formolul din comerț se diluează cu apă de robinet în proporții de 1 : 10 și apoi includerea se face la fel ca la oricare preparat proaspăt. Mediul nu trebuie să iasă pe lamelă și de aceea preparatul trebuie lutat.

Montarea în soluție saturată de levuloză (fructoză). Levuloza în soluție saturată se folosește ca mediu de montare a secțiunilor cu rezultate asemănătoare glicerinei. Prezintă totuși un inconvenient că ea poate cristaliza producînd denaturarea preparatului. De aceea, acest mediu de includere este indicat numai la efectuarea preparatelor proaspete. Se prepară din :

levuloză (fructoză)	30 g
apă	15 ml
timol	1 cristal

După prepararea soluției de levuloză, se pun pe lama de sticlă curată 2 — 3 picături de soluție, în care se așază secțiunile colorate și bine spălate. După aceea, se lasă să cadă ușor lamela deasupra secțiunilor astfel încît să nu se formeze bule de aer. Pentru o mai mare durabilitate se recomandă lutarea preparatelor (vezi pag. 73).

Montarea în lactofenol Aman. Lactofenolul Aman este un lichid cu indice de refracție 1,44, ceea ce îl face un mediu foarte bun pentru preparate. Se păstrează în sticle brune pentru a împiedica oxidarea sa (înnegrirea). Se prepară din :

acid fenic cristalizat	10 g
acid lactic	10 ml
glicerină	20 ml
apă distilată	10 ml

Medii de includere care se solidifică. Gelatina glicerinată constituie un mediu foarte adecvat pentru includerea secțiunilor vegetale, fiindcă, după o ușoară încălzire, ea devine lichidă, astfel încât permite introducerea acestora. După răcire, întărindu-se, formează o masă compactă, în care nu se pot include bule de aer sau alte impurități dacă se lucrează cu atenție în mediu curat.

Prepararea gelatinei glicerinate. Gelatina glicerinată se prepară după diferite rețete. Una dintre acestea este următoarea :

gelatină incoloră (o parte)	5 g
apă distilată (6 părți)	30 ml
glicerină pură (7 părți)	35 ml
fenol sau timol	1 cristal

Gelatina se taie mărunț sau se pisează și apoi se pune într-un vas Berzelius, se toarnă peste ea apă distilată, lăsându-se astfel să se înmoaie timp de 2—3 ore. Se amestecă apoi gelatina înmuiată cu glicerină și în acest amestec se adaugă un cristal de acid fenic sau timol. Toată această compoziție se încălzește, amestecând continuu timp de 10—15 minute într-o baie de apă până când lichidul fluid devine complet clar. Apoi se filtrează la cald prin vată de sticlă umezită sau prin hîrtie de filtru, folosind o pîlnie de sticlă încălzită. Încălzirea îndelungată împiedică gelificarea ulterioară a amestecului. După filtrare, amestecul se pune în cutii Petri.

După o altă formulă, gelatina glicerinată se prepară în felul următor : se iau 20 g foi de gelatină, se fragmentează și se pun într-un vas Erlenmeyer, împreună cu 100 ml apă distilată. Acest amestec se lasă 24—48 ore la temperatura de 52°C, timp în care gelatina se macerează complet, dar pentru omogenizarea compoziției se

amestecă la început cca un sfert de oră. Amestecul obținut se filtrează la aceeași temperatură și apoi se lasă în termostat 12—24 ore. După aceea se adaugă câteva cristale de timol sau de acid salicilic sau 5 ml de formol 40%, ca să nu se altereze gelatina. Se agită apoi bine vasul cu acest amestec și se lasă la rece pînă la solidificare. Înainte de a fi întrebuințată, gelatina se încălzește la baia mariană pînă ce se topește sau se introduce în termostat la 52°C.

Montarea secțiunilor. Cu un bisturiu sau cu un ac spatulat se desprinde din gelatina glicerinată un mic cub sau bloculeț cu laturile de 3—4 mm sau mai mare, corespunzător cu mărimea secțiunii și cu dimensiunile lamelei, care se așază pe lama de sticlă (port-obiect) curată. Această se trece de mai multe ori printr-o flacăra a unei spirtiere sau a unui bec Bunsen, pînă cînd gelatina se topește complet, evitînd fierberea care ar duce la formarea bulelor de aer. Apoi, cu ajutorul unei pense ușor încălzită, se pun repede secțiunile în gelatină topită, după care se acoperă secțiunile cu lamela; se lasă să se răcească și să se întărească gelatina glicerinată.

În cazul secțiunilor colorate și spălate, acestea se pun într-o sticlă de ceas, unde se adaugă câteva picături de glicerină care să acopere secțiunile și se lasă astfel câteva minute. După aceea se iau secțiunile cu o pensă sau cu un ac spatulat și se pun în gelatină topită pe lamă. Pentru înlăturarea bulelor de aer din preparat se înlocuiește apa din secțiuni cu glicerină în felul următor: secțiunile se trec după colorare succesiv în soluții apoase de glicerină (vezi pag. 61), în următoarele proporții: 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1, și apoi în glicerină pură. Din glicerina pură, secțiunile se trec în gelatină topită, așa cum s-a menționat anterior. În cazul în care apar totuși bule de aer în preparat, acestea se în-

lătură prin atingerea lor cu vârful unui ac simplu fierbinte sau ușor înroșit. Apoi se acoperă secțiunile cu lamela, iar pentru păstrarea lor mai îndelungată se lutează (vezi pag. 73).

O altă variantă de montare a secțiunilor în gelatină glicerinată constă în așezarea cubului sau bloculețului de gelatină pe lamelă. Aceasta se încălzește treptat la o flacără nu prea puternică, pînă cînd se licheface gelatina, evitînd fierberea ca să nu se formeze bule de aer. Secțiunile colorate și îmbibate cu glicerină, așa cum s-a arătat mai înainte, se așază pe lamă, iar lamela cu gelatina topită se pune peste secțiuni în așa fel încît să le acopere complet. Se cere o mare atenție la topirea gelatinei pe lamă sau pe lamelă, deoarece încălzirea trebuie întreruptă exact în momentul cînd aceasta s-a topit complet. În acest fel este evitată fierberea și carbonizarea gelatinei, care ar duce la formarea bulelor de aer și a unor impurități. După o altă metodă, montarea secțiunilor în gelatină se poate face folosind gelatina topită în prealabil în baia mariană sau în termostaț.

Montarea în alcool polivinilic. Un bun mediu de includere hidrosolubil este alcoolul polivinilic în amestec cu unele substanțe, acesta folosindu-se mai simplu decît glicerina gelatinată. Datorită indicelui său de refracție, care este mai mic decît al gelatinei glicerinate, detaliile structurale mai fine apar mult mai clare decît în aceasta. Soluția se prepară dintr-o suspensie obținută prin majorarea a 2 g alcool polivinilic („Mowiol N 90—98”) cu 7 ml acetonă. Se amestecă prin agitare cu 10 ml apă distilată, 5 ml glicerină și 5 ml acid lactic. Suspensia rezultată este tulbure și se încălzește apoi cea 10 minute într-o baie mariană clocotindă, pînă devine perfect limpede. Obiectele se includ în 1—2 picături din această soluție, care se întărește după o zi,

însă pentru păstrarea mai îndelungată a preparatelor este indicată lutarea lor cu lac.

Fitohistol (phytohistol). Acesta este un mediu hidrosolubil bun care se găsește în comerț gata preparat. Se prezintă ca o masă viscoasă, care după montare se îngroașă, fără a se solidifica complet. Secțiunile incluse în fitohistol își mențin diferitele colorații.

Siropul Apathy. Acesta este un amestec în părți egale de cristale de zahăr, gumă arabică și apă distilată, care se prepară astfel: se pune guma arabică într-un săculeț de tifon și se scufundă în jumătate din cantitatea totală de apă distilată. Se lasă astfel în baie mariană pînă se dizolvă. În cealaltă cantitate de apă distilată se dizolvă zahărul și apoi cele două lichide se amestecă bine pînă la perfectă omogenizare. În siropul obținut se adaugă 1 ml de formol sau cîteva cristale de timol, pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor. Secțiunile colorate se spală cu apă distilată de 2—3 ori și apoi se așază pe lamă. Deasupra lor se pun două-trei picături, în funcție de mărimea secțiunii, de sirop Apathy, apoi se acoperă cu lamela și se lutează.

Siropul Kasarinoff. Cu o compoziție chimică asemănătoare este și siropul Kasarinoff, care se prepară din :

gumă arabică	50 gr
zahăr (cristale)	20 g
apă distilată	51 ml
formol sau cîteva cristale de timol	0,5 ml

Toate acestea se dizolvă la o temperatură de 55°C și se filtrează la cald. Montarea secțiunilor în acest amestec se face ca și în siropul precedent.

Montarea în cloralhidrat. Soluția de cloralhidrat are multiple întrebuințări și constituie un mediu de includere la efectuarea preparatelor anatomice, palinologice, micologice etc. și se prepară din :

clorhidrat	40 g
gumă arabică	10 g
sirop de glucoză	5 g
acid acetic glacial	5 ml
glicerină	5 ml

Se pregătește întâi soluția de gumă arabică, punându-se praful curat de gumă într-un vas cu apă. Se iau în genere 15 g gumă pentru 30 ml apă distilată; praful de gumă se pune deasupra apei, fără a se amesteca și se lasă astfel mai multe ore să se dizolve la temperatura camerei. Se lasă apoi soluția de gumă o zi sau două să se depună impuritățile, apoi se decantează și se filtrează de două ori prin vată de sticlă. Din praf curat de glucoză și apă distilată se prepară siropul de glucoză. Se dizolvă glucoza în apă caldă și apoi se fierbe în baia mariană spre a se îngroșa.

Într-un pahar Berzelius se pun 40 g clorhidrat cristale, peste care se adaugă, tot la balanță, toate celelalte substanțe. Se încălzește totul 15—20 minute în baia marină pînă ce întregul amestec devine lichid. Se pune soluția într-o sticlă brună spre a se depune impuritățile, iar după o zi se decantează și soluția complet gata se păstrează, într-o sticlă brună cu dop rotund.

În această soluție se pot monta obiecte fără a fi nevoie de o deshidratare în prealabil. Este bine însă ca înainte de a le include în clorhidrat să fie ținute cîtva timp în acid acetic glacial.

2.1.5.2. MEDII DE INCLUDERE INSOLUBILE ÎN APĂ

Aceste medii prezintă un indice de refracție mai mare decît cele hidrosolubile, se folosesc mai ales pentru includerea obiectelor colorate și în general ele se

întăresc mai mult sau mai puțin după aplicarea lamei.

Obiectele colorate se includ cel mai bine în medii care au același indice de refracție cu ele, însă indicii de refracție ai materialelor pot să varieze chiar și în funcție de fixarea lor.

Unele medii de includere insolubile în apă sînt însă solubile în alcooli mai concentrați, iar majoritatea se dizolvă numai în xilen, benzen, cloroform ș.a. De aceea, înainte de includere, obiectele trebuie transferate treptat în alcool mai concentrat sau în xilen (vezi pag. 82).

Unele medii de includere insolubile în apă pot rămîne fluide, iar altele se solidifică.

Medii de includere care rămîn fluide. Aceste medii se folosesc numai cînd vrem să analizăm rapid secțiuni împarafinate, fără a le prelucra pentru a le face preparate durabile.

Uleiul de imersie este cel mai întrebuintat dintre mediile de includere care nu se solidifică. Mai întîi obiectele se clarifică în xilen și apoi se trec în ulei de imersie. Acest procedeu se folosește cînd pereții celulari colorați și deshidratați trebuie analizați rapid.

Uleiul de parafină are un indice de refracție relativ scăzut și datorită acestuia chiar pereții celulari nu prea subțiri și necolorați sînt totuși clar vizibili. Înainte de includere în ulei de parafină, obiectele trebuie clarificate în xilen.

Medii de includere care se solidifică. Mediile de includere insolubile în apă, dar care se întăresc, prezintă o mare importanță pentru includerea obiectelor colorate. Multe dintre acestea se găsesc în comerț și vom menționa numai cîteva din ele.

Euparalul. Este miscibil cu alcool de 95%. De aceea secțiunile colorate și trecute prin seria de alcool se transferă din alcoolul de 95% în una două picături de Eu-

păral, puse pe lamă și se acoperă cu o lamelă. După câteva zile Euparalul se întărește obținându-se astfel preparate durabile.

Acest mediu de includere se folosește de obicei la preparate obținute prin strivire și colorate cu carmin acetic sau cu orceinacetic.

Soluțiile de rășini sintetice. Sînt utilizate în prezent în majoritatea cazurilor pentru includerea secțiunilor efectuate la microtom și colorate.

Pentru aceasta, secțiunile se deshidratează mai întâi prin seria de alcool de concentrație crescîndă, după care se transferă în xilen. Se ia apoi lama cu secțiuni, încă umectată cu xilen, pe care se pune o picătură mare de rășină și apoi se acoperă cu lamela.

Dintre soluțiile de rășini sintetice utilizate pentru includerea secțiunilor colorate menționăm :

Eukitt, Diatex, Entellan, Malinol, Rbenohistol ș.a.

O importanță deosebită în alegerea soluțiilor de rășini sintetice are indicele de refracție, care trebuie să fie cît mai aproape de 1,515, pentru valorificarea deplină a obiectivelor.

Soluțiile de rășini sintetice se solidifică complet după includere, în funcție de rășină. Entellanul, de exemplu, se întărește numai după câteva ore dacă se folosesc lamele de 18/18 mm, iar cînd lamelele sînt mai mari, solidificarea durează una două zile. Alte soluții de rășini necesită un timp mai îndelungat pentru întărire.

Montarea în balsam de Canada. Balsamul de Canada este mediul de includere cel mai utilizat la efectuarea preparatelor microscopice citohistoembriologice. Se prezintă sub forma unei substanțe vîscoase, de culoare galbenă-verzuie, transparentă, cu miros aromatic, insolubilă în apă, dar solubilă în benzen, cloroform, xilen și ulei de cedru. Balsamul de Canada este o rășină extrasă din *Abies balsamea*, care se folosește la montarea defini-

tivă a secțiunilor, atît făcute cu briciul, cît și a celor incluse în diferite medii și secționate la microtom. Cel mai bun pentru montarea secțiunilor este balsamul solvit în xilen și nu în stare vîscoasă. De aceea se diluează cu xilen pînă cînd, introducînd în vasul cu balsam o baghetă, balsamul se scurge de pe ea sub formă de picături mobile care nu se întind sau introducînd bagheta de sticlă în vas, aceasta devine invizibilă. În această stare, balsamul are aproape același indice de refracție ca și sticla și astfel este indicat a se folosi.

Secțiunile după colorare și spălare sînt îmbibate cu apă, iar trecerea secțiunilor din apă direct în balsam de Canada nu este posibilă deoarece acestea se opacizează și astfel nu mai pot fi analizate.

Balsamul de Canada, fiind insolubil în apă, trebuie ca secțiunile colorate și spălate să fie întîi deshidratate și apoi clarificate prin seria de alcool etilic. După aceea alcoolul trebuie înlocuit cu xilen în final are loc montarea secțiunilor în balsam de Canada.

Prin deshidratare, care se realizează trecînd secțiunile prin seria de alcool etilic, apa din țesuturi este scoasă și înlocuită de alcool, iar prin tratare cu xilen acesta elimină și înlocuiește alcoolul.

Xilenul este o substanță intermediară între alcool și balsamul de Canada și de aceea el formează un amestec perfect cu alcoolul absolut, iar în stare pură se amestecă cu balsamul de Canada.

Deshidratarea secțiunilor colorate și spălate se face astfel: în vasul cu secțiuni se adaugă, cu pipeta, alcool de 15%. După cîteva minute se absoarbe, tot cu pipeta, alcoolul de 15% și se înlocuiește cu alcool de 35%. Se lasă secțiunile cîteva minute în această concentrație de alcool, după care se repetă operația de îndepărtare și adăugare de alcool etilic de concentrație din ce în ce mai mare astfel: 55%, 70%, 80%,

90%, 95% și în final alcool absolut, în care se trec de două ori.

Urmează acum eliminarea alcoolului cu xilen. Pentru aceasta secțiunile se trec într-un amestec de alcool absolut două părți și o parte de xilen (2:1).

Se lasă în acest amestec câteva minute și se trec într-un alt amestec de alcool și xilen în proporție de una parte alcool și una parte xilen (1 : 1), după care îndepărtându-se și acesta la câteva minute, se trec secțiunile într-un amestec de xilen două părți și o parte de alcool absolut (2 : 1).

Pentru eliminarea ultimelor urme de alcool, secțiunile se trec de două ori în xilen curat, după care pot fi montate în balsam de Canada

Această operație se realizează luînd pe rînd cu pensa sau cu un ac spatulat secțiunile din xilen, și punîndu-le pe lama de sticlă perfect curată. Peste acestea se pun una două picături de balsam de Canada, după care se acoperă rapid cu lamela astfel încît să nu se formeze bule de aer.

Secțiunile astfel montate se păstrează sub formă de preparate durabile un timp nelimitat, ferite de praf și umezeală, de obicei în cutii de lemn sau confecționate din carton, bine închise.

Preparatele respective, pentru a fi identificate, se notează fie cu tuș direct pe lamă, la una din extremități, fie lipind pe lamă o etichetă cu datele corespunzătoare.

Montarea în rășină de Dammar. Rășina de Dammar se întrebuintează uneori dizolvată în xilen, în locul balsamului de Canada, avînd calitatea de a fi complet incoloră, dar și dezavantajul că este sfărîmicioasă în stare uscată.

Un amestec de balsam de Canada și rășină Dammar în proporție de unu la trei (una parte balsam de Canada și trei părți rășină Dammar), dizolvate în xilen, constituie adeseori un mediu întrebuintat în efectuarea preparatelor microscopice de botanică.

2.1.6. LUTAREA PREPARATELOR

Preparatele montate în glicerină, cloralhidrat sau în alte medii de includere, care conțin un procent oarecare de apă, precum și preparatele proaspete, pot fi menținute un timp mai îndelungat prin lutarea sau lipirea lor. Aceasta constă în lipirea marginilor lamelei care acoperă preparatul cu parafină sau cu un lut special, iar în lipsa acestora, chiar cu gumă arabică.

Lutarea cu parafină. Înainte de lutare se șterg și se usucă bine marginile lamelei, precum și lama port-obiect de jur împrejur.

Parafina topită în prealabil, se aplică pe marginile lamelei cu ajutorul unei anse sau a unei sîrme de cupru îndoită la vîrf în forma literei L.

Lutarea cu parafină se realizează foarte ușor, dar prezintă un dezavantaj, ea fiind ușor casabilă și fragilă. De aceea se recomandă ca peste parafină să se pună cu ajutorul unei pensule straturi subțiri și succesive de balsam de Canada, care prin uscare devine ca un lac impermeabil care împiedică uscarea preparatului. Straturile de balsam de Canada se aplică după ce ultimul strat s-a uscat complet.

Lutarea cu lut special. Lutarea cea mai bună a preparatelor se face cu un lut special care aderă perfect de marginile lamelei, chiar dacă acestea sînt ușor umezite.

Lutul cel mai întrebuintat se prepară din lanolină și colofoniu, în următoarele proporții :

lanolină pură (sau ceară)	20 g
colofoniu (sacîz)	80 g

Întrucît lanolina din comerț conține o cantitate oarecare de apă, aceasta se încălzește într-o capsulă de porțelan pînă la lichefierea și deshidratarea ei completă. După ce spuma produsă prin fierbere a dispărut, se adaugă colofoniu pisat și se continuă încălzirea amestecului, agitîndu-l mereu cu o baghetă, pînă cînd se topește complet și colofoniul, iar lichidul obținut devine omogen. Acest amestec se toarnă în cutii Petri, cristalizoare sau în cutii de tablă, unde se lasă să se răcească, solidificîndu-se rapid..

Acest amestec obținut, numit lut, se aplică pe marginile lamelei cu aceeași ansă sau sîrmă îndoită la capăt. Înainte de aceasta, ansa trebuie încălzită la o flacără, apoi se introduce în lut și se aplică întîi pe una din laturile lamelei sub forma unui strat continuu, această operație repetîndu-se și pe celelalte margini ale lamelei.

2.2. INCLUDEREA MATERIALELOR VEGETALE IN DIFERITE MEDII

Cunoașterea structurii amănunțite a diferitelor organe vegetale, precum și a diferențierii lor, se poate face numai prin analiza unor secțiuni succesive foarte fine și de grosime constantă. Asemenea secțiuni se obțin cu ajutorul microtomului, cu condiția ca materialul vegetal de studiu să fie inclus într-un mediu de includere. Pentru includere, obiectul respectiv se îmbibă aproape complet cu un lichid, care apoi se solidifică, obținîndu-se în felul acesta un corp cu o rezistență mai mult sau mai puțin omogenă. Astfel, includerea

materialului de studiu constă în impregnarea lui cu o anumită substanță care îi conferă proprietăți noi în ceea ce privește consistența, omogenitatea și elasticitatea. Alegerea mediilor de includere trebuie să se facă astfel încît, în stare solidificată, mediul respectiv să fie cel puțin la fel sau mai tare decît punctele cele mai dure ale materialului. De asemenea, secțiunile trebuie să fie cu atît mai subțiri cu cît mediul de includere este mai dur.

În funcție de material și de obiectivul urmărit, se pot utiliza diferite medii de includere. Dintre substanțele care se folosesc frecvent ca mediu de includere a obiectelor vegetale, în vederea secționării acestora cu microtomul, sînt : parafina, celoidina, gelatina, guma arabică, unele rășini sintetice și anumite aliaje metalice. Înainte de includere, materialul vegetal necesită însă anumite operațiuni pregătitoare.

Rezistența necesară secționării unui obiect vegetal se poate obține nu numai prin includerea acestuia în diferite medii, ci și prin congelare. Există, de asemenea, metode combinate de includere și congelare.

2.2.1. ETAPELE NECESARE INCLUDERII ÎN PARAFINA

Metoda de includere cea mai utilizată în tehnica microscopică este includerea în parafină. Acest procedeu prezintă avantajul că este relativ simplu, nu necesită prea mulți reactivi și permite obținerea unei serii continue de secțiuni, precum și analiza atît a unor structuri grosiere cît și a unora de o finețe deosebită. În general, grosimea secțiunilor efectuate prin diferite obiecte incluse în parafină variază între 5 și 30 μ , fiind însă posibile și secțiuni mai groase sau mai subțiri.

Includerea în parafină a diferitelor obiecte vegetale prezintă însă și unele dezavantaje. Astfel, multe obiecte suferă contracții în plus sau în minus pronunțate, care apar uneori încă de la deshidratare și se datoresc mai mult acțiunii căldurii necesare pentru îmbibarea lor cu parafină lichidă. Se întâmplă, de asemenea, că pereții celulari, mai ales cei puternic lignificați, să devină atât de fragili încât se rup la secționare, dar aceasta se poate preveni prin tratamente speciale. Trebuie să se țină seama și de faptul că prin metoda parafinei se mențin numai unii constituenți celulari, deoarece în afară de apă și substanțele solvite în ea, sînt extrase de obicei și lipidele, astfel că pentru evidențierea lipidelor, această metodă este inutilizabilă.

Includerea în parafină se desfășoară în următoarele etape caracteristice: *fixarea, spălarea, deshidratarea, clarificarea și impregnarea cu parafină*. De aceea materialul vegetal de studiu care urmează să fie inclus în parafină trebuie în prealabil fixat în unul din fixatorii utilizați în diverse cercetări.

2.2.1.1. FIXAREA MATERIALULUI VEGETAL

Prin fixare se înțelege acea operație prin care un organism reprezentat printr-o celulă sau o parte a unui organism vegetal (țesut sau organ), în urma tratării lui cu o soluție care este un fixator, moare în stadiul în care a fost introdus în aceasta, menținînd nealterată structura și componentele structurale ale materialului respectiv.

Un fixator bun nu trebuie să formeze în materialul fixat structuri artificiale (artefacte) sau să determine apariția de detalii structurale secundare. Este ușor de înțeles că un astfel de fixator nu va da o imagine

falsă anatomiei materialului pe care-l studiem. În același timp, mediul de fixare trebuie să pătrundă cît mai repede în materialul viu. Reiese deci că pentru o bună fixare, obiectele trebuie să fie cît mai mici și în felul acesta căile de difuziune sînt mai scurte și viteza de pătrundere mai mare. Desigur că nu poate fi dată o mărime precisă (exactă) a obiectului ce urmează a fi fixat, această depinzînd în primul rînd de natura soluției fixatoare și în al doilea rînd de gradul în care trebuie să se conserve structurile. De exemplu, alcoolul pătrunde mai repede în obiectele vegetale, decît o soluție de OsO_4 . Drept urmare, în cazul folosirii alcoolului sau amestecurilor cu alcooli, obiectele pot avea lungimi de un centimetru sau mai mari, iar în cazul soluției de OsO_4 se admit lungimi de maximum unu doi mm. De asemenea, obiectele ce urmează a fi studiate anatomic pot fi mai mari decît materialul ce urmează a fi studiat citologic.

Dacă materialul ce urmează a fi fixat conține mult aer, pătrunderea fixatorului este foarte mult îngreuiată. În această situație, se introduce materialul înainte de fixarea definitivă, într-un amestec de alcool — acid acetic glacial (3 : 1).

În cazul în care avem de-a face cu obiecte ce au suprafața greu umectabilă (hidrofuge), (de exemplu, frunzele prevăzute cu o cuticulă groasă), pătrunderea mediului de fixare este mult împiedicată. Acest inconvenient poate fi îndepărtat dacă se adaugă soluției de fixare o substanță care coboară tensiunea superficială, cum este de exemplu saponina 0,2%. Întrucît însă o asemenea substanță are acțiune nocivă față de țesuturi și poate produce și artefacte trebuie mai întîi să se verifice care sînt fenomenele secundare ce apar și apoi să se efectueze fixarea. Cel mai indicat însă este ca

materialul greu umectabil să se țină în prealabil într-un amestec alcoolic.

Plantele superioare pentru a fi bine fixate trebuie să fie pe deplin turgescente înainte de efectuarea acestui proces.

De asemenea, la o fixare se obțin rezultate bune numai atunci cînd soluția care acționează asupra materialului este cît mai concentrată. Este indicat a se ține seama de faptul că în timpul fixării mediul de fixare se amestecă cu sucule vacuolar și în felul acesta se diluează. Această diluare poate fi eliminată dacă volumul soluției fixatoare depășește cu 50 pînă la 100 părți, volumul obiectului ce urmează a fi fixat.

În majoritatea cazurilor, fixarea se execută la temperatura camerei. Se spune, pe bună dreptate, că fixarea reprezintă „piatra unghiulară” sau fundamentul unei bune cercetări citohistologice.

Necesitatea fixării materialului și metodele de fixare sînt dictate de scopul pe care-l urmărim în cercetarea respectivă.

Se deosebesc în esență două grupe de soluții de fixare și anume: bazice și acide, ultimele fiind cel mai mult utilizate în tehnica botanică.

Fixatorii bazici se folosesc mult mai puțin în cercetările fitoanatomice decît cei așizi, deoarece materialul fixat cu primii se colorează în general slab.

De obicei, pentru o fixare bună se folosesc amestecuri de mai multe lichide care se prepară cu puțin timp înainte de folosire.

Durata fixării depinde atît de natura și mărimea materialului, cît și de însăși soluția fixatoare.

Sînt cazuri în care materialul se ține în fixator timp relativ scurt, pentru a nu se produce o „suprafixare”, care determină apariția de artefacte. Uneori se poate

observa un efect de macerație, iar altele, soluția de fixare are acțiune conservatoare, obiectele fiind păstrate în ele un timp îndelungat.

Pentru fixare, obiectele se introduc în borcănase mici, cilindrice, flacoane sau eprubete, care se astupă cu dopuri, pentru a nu avea loc evaporarea, mai ales în cazul utilizării soluțiilor alcoolice.

2.2.1.2. SPĂLAREA

După scoaterea obiectelor din fixator, urmează imediat spălarea acestora, care se face în mod diferit, în funcție de fixatorul utilizat.

Spălarea obiectelor fixate se face de obicei prin menținerea acestora la un jet de apă de robinet sau prin schimbarea repetată a apei. În cazul în care fixarea s-a făcut în soluții cu amestecuri de alcool, spălarea eficientă se face utilizând în loc de apă, alcool în concentrația celui din soluția fixatoare.

Astfel, materialul fixat în *Carnoy* sau în alcool de 70% se trece după fixare direct în seria de alcool etilic, astfel: materialul vegetal fixat în *Carnoy* se trece în alcool de 95%, apoi în alcool absolut de două ori, în alcool absolut + cloroform, în amestec de cloroform cu parafină, după care se trece la includerea în parafină (vezi pag. 90).

Materialul fixat în alcool de 70% se trece în alcool de 80%, 90%, 95%, alcool de două ori etc.

Spălarea materialului fixat în *Navașin-Bruun* se face în felul următor: se scot cu o pensă obiectele din eprubeta sau sticluta în care au fost fixate și se pun dacă sînt de dimensiuni mici într-un vas perforat, pe care-l astupăm cu un dop de plută sau se pun într-o bucată de tifon care se leagă ca o pungă. Vasul per-

forat sau pungulițele de tifon care conțin obiectele fixate se pun într-un cristalizor mai mare, peste care se lasă să curgă un jet slab de apă de robinet timp de 24 ore. Prin spălare, se elimină excesul de fixator care împiedică o bună aderare a colorantului.

După spălare, materialul vegetal fixat este îmbibat cu apă și de aceea se trece la îndepărtarea excesului de apă prin deshidratarea acestuia.

2.2.1.3. DESHIDRATAREA

După îndepărtarea excesului de fixator prin spălare, urmează scoaterea apei din țesuturi cu ajutorul alcoolului etilic, în concentrații crescînde și succesive, ceea ce constituie *deshidratarea*.

Deshidratarea obiectelor fixate și spălate se face în majoritatea cazurilor cu alcool etilic și mai rar cu alte lichide, ca de exemplu, cu glicerină. Prin deshidratare, materialele vegetale nu trebuie trecute direct din apă în alcool concentrat, fiindcă structurile de curînd fixate pot fi ușor distruse de curenții puternici care se produc la egalizarea concentrațiilor. De aceea, obiectele spălate cu apă se scot cu pensa din vasul perforat sau din pungulițele de tifon și se pun într-un flacon sau eprubetă în care se află alcool cu o concentrație de 15%, unde curenții de compensare a concentrației sînt mai slabi și inofensivi pentru structuri. Flaconul se astupă cu un dop de plută și se lasă 30 minute. Numai după ce obiectele s-au îmbibat complet cu acest alcool slab, folosindu-ne de o pipetă sau prin decantare, înălăturăm alcoolul de 15% și adăugăm alcool mai concentrat, de 35%. În același mod, obiectele sînt introduse treptat în alcool cu concentrație din ce în ce mai

mare : 55%, 70%, 80%, 90%, 95%, ajungînd pînă la alcool absolut, unde se termină deshidratarea.

În general, în fiecare concentrație de alcool, obiectele se lasă cca o jumătate de oră pînă la două și chiar pînă la 12 ore, durata depinzînd de mărimea și consistența acestora. În alcool absolut, obiectele sînt trecute de două ori, a doua oară fiind lăsate de la 12—24 ore, în funcție de mărimea obiectului. Astfel, vîrfurile vegetative ale rădăcinii de *Allium cepa*, în primele concentrații de alcool pînă la 90%, se lasă cîte două ore, iar începînd de la alcoolul de 90%, se țin cîte trei ore. În cazul obiectelor și mai mici, de exemplu vîrfurile vegetative ale ramurilor de *Elodea*, se lasă 30 minute în concentrațiile pînă la 70%, o oră pînă la 95% și apoi de două ori cîte o oră în alcool etilic absolut sau în alcool izopropilic absolut.

În schimb, obiectele mai mari (de exemplu, fragmente de ramuri, tulpini, rădăcini de cca 5 mm lungime) se lasă în seriile de alcool pînă la 70% cîte 5 ore în fiecare concentrație, în alcool de 90% și 95% cîte 12 ore și în fine în alcool absolut de 2 ori cîte 12 ore succesiv.

Menționăm că nu este necesară, pentru toate includerile în parafină, deshidratarea completă cu alcool absolut 100%. În aceste cazuri, deshidratarea trebuie oprită cînd obiectele sînt complet îmbibate cu alcool 90% (vezi pag. 82).

În cursul deshidratării obiectelor vegetale numită și „deshidratare în trepte de alcool”, are loc nu numai deshidratarea acestora, ci și întărirea structurilor respective, ceea ce este deosebit de important pentru materialele care după fixare rămîn relativ moi, ca după fixarea cu amestecul cromacetic.

Este, de asemenea, important ca diferențele de concentrație ale alcoolului să nu fie prea mari, astfel ca

să permită îmbibarea completă a obiectelor. La fel, duratele menținerii obiectelor în alcoolul de diferite concentrații să nu fie prea mari, deoarece alcoolul mai slab (de exemplu 30%) are efect macerator puternic, în timp ce alcoolul concentrat întărește pereții celulari, făcând secționarea mai dificilă. Numai alcoolul 70% nu produce asemenea modificări, încît în această concentrație de alcool obiectele pot fi păstrate foarte mult timp.

Diferențele de concentrație în seria de alcool depind de sensibilitatea obiectelor supuse deshidratării, însă pentru majoritatea materialelor vegetale care nu se contractă cu ușurință este suficientă seria următoare de alcool: 15%, 35%, 55%, 70%, 80%, 90%, 95% și alcool absolut (100%). Pentru obținerea diferitelor concentrații de alcool pot fi utilizate datele din tabelul 1.

Ca alcool absolut se folosește în prezent mai mult alcoolul izopropilic, mult mai ieftin decît alcoolul etilic absolut. În schimb, alcoolul izopropilic nu este atît de higroscopic și de aceea obiectele trebuie lăsate în el, pentru deshidratare, mai mult timp decît în cel etilic. Un avantaj al izopropanolului este acela că poate fi menținut multă vreme anhidru, ceea ce în cazul etanolului este mai greu.

Obiectele ale căror țesuturi se contractă ușor, cum sînt de exemplu algele, se deshidratează cu glicerină (vezi pag. 61).

Deshidratarea se mai poate face și după metoda lui *Sitte*, adică cu acetonă în vid.

2.2.1.4. CLARIFICAREA CU ALCOOL-CLOROFORM

Etapa imediat următoare deshidratării este tratarea cu cloroform a materialului de împarafinat, în vederea clarificării acestuia și înlocuirii alcoolului pă-

Tabelul Gay-Lussac pentru diluarea alcoolului
(Cantitatea de apă, în ml, necesară pentru a dilua 100 cm³ de alcool)

Alcool de obținut (în %)	Alcool de diluat									
	100	99	98	97	96	95	94	93	92	
95	6,50	5,15	3,83	2,53	1,25	6,41	5,10	3,80	2,54	
90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	13,33	11,96	10,59	9,24	
85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	20,95	19,49	18,04	16,61	
80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	29,52	27,97	26,43	24,94	
75	37,58	35,90	34,28	32,67	31,08	39,18	37,53	35,89	34,27	
70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	50,22	48,45	46,70	44,85	
65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	63	61,10	59,21	57,33	
60	72,82	70,80	68,80	66,85	64,92	77,99	75,93	73,88	71,85	
55	88,60	86,42	84,28	82,16	80,06	95,89	93,64	91,41	89,19	
50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	117,57	115,09	112,64	110,18	
45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	144,46	141,70	138,95	136,23	
40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	178,71	175,60	172,49	169,39	
35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	224,08	220,49	216,90	213,33	
30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	287,28	283,02	278,77	274,53	
25	308,90	304,52	300,18	295,86	291,56	381,90	376,64	371,40	366,16	
20	408,50	403,13	397,79	392,47	387,17	539,66	532,74	525,83	518,94	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	855,55	845,31	835,08	824,86	
10	907,09	896,73	886,40	876,10	865,15					

Tabelul 1 (continuare)

Alcool de obținut (în %)	Alcool de diluat									
	90	85	80	75	70	65	60	55	50	
85	6,56									
80	13,79	6,83								
75	21,89	14,48								
70	31,05	23,14	7,20	7,64						
65	41,53	33,03	15,35	16,37	8,15	8,76				
60	53,65	44,48	24,66	26,47	17,58	19,02	9,47			
55	67,87	57,90	35,44	38,32	28,63	31,25	20,47	10,35		
50	84,71	73,90	48,07	52,43	41,73	46,09	34,46	22,90	11,41	
45	105,34	93,30	63,04	69,54	57,78	64,48	51,43	38,46	25,55	
40	130,80	117,34	81,38	90,76	77,58	87,93	73,08	58,31	43,59	
35	163,28	148,01	104,01	117,82	102,84	118,94	101,71	84,54	67,45	
30	206,22	188,57	132,88	153,61	136,04	162,21	141,65	121,16	100,73	
25	266,12	245,15	171,05	203,61	182,83	226,98	201,43	175,96	150,55	
20	355,80	329,84	244,30	278,01	252,58	334,91	301,07	267,29	233,64	
15	505,27	471,00	304,01	402,81	368,83	551,06	500,50	450,19	399,85	
10	804,50	753,65	436,85	652,21	601,60					

truns în obiecte cu o substanță care să formeze un amestec perfect cu alcoolul. Această substanță trebuie să nu altereze conținutul protoplasmatic și în același timp să permită dizolvarea și pătrunderea parafinei în țesuturile obiectului. În acest scop, se folosesc diferite substanțe, ca : benzenul, xilenul (xilolul), cloroformul, toluolul, acetona, esența de terebentină și terpineolul. Dintre toate acestea, rezultatele cele mai bune în clarificarea obiectelor se obțin folosind, în acest scop, cloroformul.

Față de xilen sau benzen, cloroformul prezintă avantajul că face obiectele mult mai puțin casante, dar numai atunci când acestea sînt complet deshidratate. Cloroformul trebuie însă să fie anhidru, ceea ce se obține prin adăugarea de CaCl_2 ca deshidratant. De asemenea, cloroformul pătrunde în țesuturile obiectelor deshidratate foarte încet, ceea ce mărește mult durata etapelor preliminare includerii în parafină. Ținînd seama și de faptul că cloroformul este toxic, metoda cu cloroform nu trebuie să devină o metodă standard, ci să fie utilizată cînd nu se obțin rezultate bune cu xilen sau benzen.

În cursul trecerii obiectelor în cloroform se observă că atunci cînd cloroformul a înlocuit alcoolul pătruns în obiecte, acestea cad pe fundul vasului. Pentru a se ajunge la acest rezultat este însă necesar ca volumul de cloroform să depășească de 10 ori pe cel al obiectului.

În practica curentă se folosește însă la început amestecul de alcool etilic absolut sau de izopropanol cu cloroform, pentru ca îmbibarea obiectelor cu cloroform să se facă treptat. Acest amestec de alcool și cloroform se realizează în următoarele trei concentrații :

- 1) alcool etilic absolut sau izopropanol abs. + cloroform — 2 : 1 (3 : 1)
- 2) alcool etilic absolut sau izopropanol abs. + cloroform — 1 : 1
- 3) alcool etilic absolut sau izopropanol abs. + cloroform — 1 : 2 (1 : 3)

Astfel, după ce obiectele au fost deshidratate, în urma trecerii prin seria de alcool cu concentrații diferite și de două ori prin alcool absolut, se elimină din vas alcoolul absolut cu ajutorul pipetei sau prin decantare. Apoi se pune peste obiecte primul amestec de alcool absolut și cloroform 3 : 1 (2 părți alcool absolut și 1 parte cloroform); se lasă în sticluta sau eprubeta astupată cu dop de plută pînă cînd obiectele s-au scufundat complet în el, adică pînă cînd ele devin submerse.

Se înlătură apoi primul amestec de alcool absolut cu cloroform (2 : 1) și se pune peste obiecte, în același mod, amestecul următor (1 : 1), în care se lasă, pînă cînd ele devin submerse. La fel se procedează și cu al treilea amestec (1:2), toate aceste operațiuni de schimbare a amestecului putînd să dureze și cîteva zile, mai ales cînd procentul de cloroform este mărit. Acest proces se poate accelera prin adăugarea cîtorva picături de eter; în acest caz există pericolul uscării obiectelor dacă ele plutesc.

Din ultimul amestec de alcool absolut și cloroform, obiectele se transferă în cloroform pur de două ori, în care, de asemenea, se lasă pînă cînd ele devin submerse, ceea ce poate să dureze iarăși foarte mult. Se poate accelera și acest proces de îmbibare a obiectelor cu cloroform, dacă la cloroformul pur se adaugă cîteva bucățele de parafină.

2.2.1.5. CLARIFICAREA CU TERPINEOL

Aplicarea acestei metode este indicată atunci cînd pereții celulari devin prea fragili, după utilizarea altor substanțe pentru clarificare.

Terpineolul dizolvă mai puțin parafina decît xilenul, benzenul sau cloroformul și totodată el este și mai puțin sensibil la apă decît acestea. De aceea, obiectele se transferă direct din alcoolul de 90% în amestec de alcool cu terpineol, renunțîndu-se la alcoolii cu concentrație maximă.

Obiectele se introduc pe rînd în următoarele amestecuri :

etanol 90% + terpineol — 2 : 1

etanol 90% + terpineol — 1 : 1

etanol 90% + terpineol — 1 : 2

În aceste amestecuri, obiectele trebuie menținute mai mult timp, cca 12—24 ore. După aceea, ele se trec de două ori în terpineol pur, lăsîndu-le de fiecare dată cîte 24 ore sau chiar mai mult, după care timp obiectele devin translucide, dar nu complet transparente.

În toate metodele de clarificare a obiectelor, prezentate pînă aici, acestea erau deshidratate și clarificate în soluții separate. Există însă posibilitatea ca aceste două operațiuni să se realizeze cu o singură soluție, dacă aceasta se poate amesteca cu o oarecare cantitate de apă, ea putînd să dizolve și parafina. O asemenea substanță este, de exemplu *butanolul terțiar* și utilizarea ei este din ce în ce mai mare, întrucît prin clarificare și deshidratare concomitentă se obțin blocuri de parafină foarte bune de secționat.

2.2.1.6. CLARIFICAREA CU BUTANOL TERȚIAR

Butanolul terțiar prezintă avantajul că dizolvă destul de bine parafina și că nu prea influențează asupra secționării obiectelor; dezavantajul acestuia constă în aceea că se solidifică la 25°, încât trebuie ușor încălzit la folosire și necesită prudență în cursul întrebuințării, din cauza inflamabilității sale.

Și în cazul folosirii butanolului terțiar, îmbibarea obiectelor cu această substanță se face, de asemenea, treptat, evitându-se în felul acesta artefactele.

În general, în această metodă se folosesc următoarele patru amestecuri, indiferent de consistența obiectelor:

	I	II	III	IV
apă	50	30	15	—
etanol (95%)	40	50	50	45
butanol terțiar	10	20	35	55

Obiectele vegetale fixate și spălate apoi cu apă, se introduc mai întâi în alcool 30% și după aceea succesiv în amestecurile menționate. Dacă spălarea obiectelor s-a făcut cu alcool 70%, atunci obiectele pot fi introduse direct în primul amestec. La fel se procedează și cu materialele fixate în alcool-formol-acid acetic glacial (AFE).

În funcție de consistența și mărimea lor, obiectele sînt lăsate 2—12 ore în fiecare amestec, iar apoi un număr dublu de ore în două părți de butanol terțiar pur (amestecul IV). În acesta, materialele pot rămîne și mai mult timp, întrucît pereții celulari nu devin fragili.

Obiectele puse în butanol terțiar pur, în care ele nu devin transparente, se transferă apoi, pentru îmbibare cu parafină, în două părți egale de butanol și

ulei de parafină. După aceea se pune la solidificat parafina într-un vas Petri, deasupra căruia se depune un strat de amestec din butanol și ulei de parafină. După introducerea obiectelor în acesta, vasul se pune în termostat, reglat la temperatura corespunzătoare parafinei în care vor fi incluse obiectele (vezi pag. 90).

2.2.1.7. CLARIFICAREA CU BENZEN ȘI XILEN

Dintre substanțele utilizate după deshidratarea obiectelor pentru clarificarea lor, menționate anterior, cele mai ieftine și mai ușor de lucrat sînt benzenul și xilenul. Ambele prezintă avantajul că prin folosirea lor se pot obține blocuri de parafină bune pentru secționat, chiar dacă deshidratarea obiectelor nu s-a făcut complet. În plus, ambele substanțe fac ca obiectele complet îmbibate cu acestea să devină perfect transparente, cu excepția pereților celulari lignificați, astfel că ne putem da seama cînd s-a terminat clarificarea acestora.

Uneori obiectele clarificate cu benzen și xilen devin casante, dar această deficiență se poate remedia printr-o infiltrație cu apă și glicerină a obiectelor împarafinate (vezi pag. 61). Cel mai bine este ca la asemenea materiale să se folosească cloroform sau terpineol ca mediu intermediar înainte de împarafinare.

După această metodă, obiectele rămase la sfîrșitul deshidratării în izopropanol absolut, se transferă într-un amestec format din părți egale de izopropanol și xilen (respectiv benzen), unde se lasă, după mărime și densitate, 1—12 ore. Apoi se trec în lichidul intermediar pur, adică în xilen, unde stau tot atîtea ore; în acest interval de timp, se schimbă odată xilenul și obiectele devin transparente, cu excepția pereților celulari lignificați.

Transparența obiectelor prezintă dezavantajul că acestea nu se mai observă bine în parafina lichidă, îngreunând astfel orientarea lor. De aceea este bine ca la ultima concentrație de alcool folosită la deshidratare să se adauge puțină eozină, care colorează obiectele făcându-le astfel vizibile. Culoarea roșie a acestora dispare în cursul tratării lor cu soluții apoase sau alcoolice.

După prezentarea diferitelor metode utilizate pentru clarificarea obiectelor în vederea împarafinării, menționăm că pe parcursul timpului s-au selectat dintre acestea numai câteva. În general, se preferă metoda butanolului terțiar datorită simplității utilizării ei și calității blocurilor de parafină obținute. Numai când nu dispunem de butanol terțiar, putem folosi ca substanțe intermediare xilenul sau benzenul, iar cloroforul sau terpineolul îl întrebuițăm atunci când xilenul sau benzenul fac obiectele prea fragile.

2.2.1.8. INCLUDEREA ÎN PARAFINĂ

Parafina cea mai bună pentru includere este parafina produsă special pentru cercetări histologice, care prezintă puncte de topire diferențiate și poate fi utilizată fără o pregătire în prealabil. Alegerea parafinei cu un anumit punct de topire diferă: dacă secționarea obiectelor incluse în parafină se face la o temperatură relativ scăzută a camerei ($15-16^{\circ}\text{C}$), se folosește parafina cu punctul de fuziune mic, adică la 52°C , iar la temperatura obișnuită a camerei este indicată folosirea parafinei cu punctul de fuziune de $58-60^{\circ}\text{C}$. Trebuie, de asemenea, să se țină seama de faptul că secțiuni foarte subțiri se obțin de obicei la o temperatură constantă, cu parafina dură, adică cu punct de topire mărit, în timp ce pentru obținerea unor

secțiuni groase se folosește o parafină moale, cu punctul de topire foarte scăzut.

Parafina se păstrează cel mai bine în stare topită în termostată, într-un vas cu mîner și cioc. Dacă parafina este impurificată cu particule de praf, ea se poate purifica ușor filtrînd-o prin hîrtie de filtru obișnuită ținută în termostată la o temperatură potrivită.

Parafina necesară îmbibării obiectelor se toarnă în vase Petri mici (cu 7 cm diametru), care nu se acoperă cu capac. Aceste vase se pun într-un termostată cu aerisire bună, care să permită evaporarea din parafină a substanțelor intermediare utilizate.

Înainte de introducerea în termostată a obiectelor puse în parafină pură topită, trebuie reglată temperatura acestuia. În acest scop trebuie să ținem seama de faptul că temperatura termostatului este constantă atunci cînd temperatura indicată de termometru rămîne constantă timp de una două ore. Numai atunci obiectele puse în parafină topită trebuie introduse în termostată; în acest fel se evită supraîncălzirea sau solidificarea parafinei. Temperatura termostatului se stabilește în general cu 5°C mai mult față de punctul de topire al parafinei, evitînd temperaturi mai ridicate, care pot mări fragilitatea unor pereți celulari.

Odată rezolvate toate aceste probleme, deosebit de importante în obținerea unei împarafinări foarte bune, se trece la includerea materialului vegetal în parafină, etapă care se desfășoară în două faze: *împregnarea* (îmbibarea) cu parafină și *montarea în parafină* (includerea propriu-zisă).

Împregnarea (îmbibarea) cu parafină. După ce obiectele au devenit submerse a doua oară în cloroform pur, se elimină acesta cu ajutorul unei pipete, apoi se pune peste obiecte un amestec de cloroform și para-

fină supraîncălzită în proporție de 1 : 1, unde se lasă 12—24 ore (după mărimea obiectului), la temperatura camerei. Trebuie să nu uităm că vasul în care sînt obiectele în amestec de cloroform și parafină să fie astupat cu dop de plută.

După acest interval de timp, se scoate dopul și vasul cu obiectele de împarafinat se pune în termostat, la temperatura corespunzătoare, unde se lasă de la o jumătate de oră pînă la patru ore, în funcție de mărimea obiectului. Cu cît obiectele sînt mai mari, cu atît se țin mai mult, chiar cîteva zile, pentru o impregnare cît mai bună cu parafină a materialului. Apoi, cu ajutorul unei pense mereu încălzită la flacără, se scot obiectele din amestecul de cloroform și parafină 1 : 1 și se trec într-un alt vas (sticlă de ceas sau vas mic Petri) cu parafină curată supraîncălzită. Acesta se introduce în termostat, unde se lasă 15 minute pînă la cîteva ore, în funcție de mărimea obiectului.

Materialul odată introdus în parafină lichidă aceasta trebuie să rămînă fluidă pînă la formarea blocului de parafină. Dacă se răcește pe parcurs, nu se trece la simpla topire a parafinei fiindcă obiectele ar putea deveni dure și casante, ci trebuie scoase din parafină cu substanța intermediară folosită (de exemplu, cloroform), înainte de a începe impregnarea lor cu parafină.

Obiectele trebuie să fie bine îmbibate cu parafină lichidă, iar substanța intermediară utilizată să se evapore, deoarece rămîn bule de aer în blocurile de parafină, care le dau un aspect spongios și îngreuiază secționarea acestora.

De obicei, obiectele se transferă în parafină pură lichidă o singură dată, dar pentru o împarafinare cît mai bună se recomandă o nouă trecere în parafină lichidă. În ambele cazuri se lasă aceeași durată de

timp care trebuie să fie echivalentă cu timpul cît au stat în amestecul de cloroform-parafină. Pentru unele obiecte mai greu impregnabile sînt necesare însă durate mult mai mari. În a doua parafină lichidă în care au fost transferate obiectele, nu trebuie să se mai simtă mirosul cloroformului (substanței intermediare folosite); numai atunci se poate trece la includerea propriu-zisă.

În cazul în care nu dispunem de un termostat adecvat, putem realiza temperatura constantă necesară impregnării, folosindu-ne de un bec cu incandescență. În acest caz se pune parafina într-un pahar Berzelius și deasupra acestuia se fixează becul pe un stativ. După aprinderea becului, se potrivește distanța pînă la pahar astfel ca partea superficială a parafinei să fie lichidă, iar cea de jos solidă. Obiectele introduse în pahar se lasă în jos, oprindu-se la limita dintre parafina lichidă și cea solidă, unde se pot supraîncălzi.

Montarea în parafină (includerea propriu-zisă). Aceasta este a doua și ultima fază a includerii în parafină. Includerea se face în vase speciale, cum sînt băile de porțelan, material plastic, sau se pot face din folie de aluminiu sau hîrtie de desen, cutiute de mărime potrivită. Se pot folosi, de asemenea, colțare speciale de includere, care se strîng cu ajutorul a două cleme.

Vasul în care se includ obiectele, indiferent de materialul din care este confecționat, se unge uniform pe toate fețele cu un strat foarte subțire de glicerină. Vasul de porțelan sau metal se încălzește ușor, trecîndu-l de cîteva ori printr-o flacără sau se așază pe o platină șofantă sau pe o placă de sticlă sau de metal încălzită. Se umple apoi rapid vasul cu parafină curată topită, avînd punctul de fuziune adecvat. Cantitatea de parafină în vas nu trebuie să fie prea mare, pentru a putea vedea obiectele prin transpa-

rență după solidificarea parafinei. Cu ajutorul unei pense, încălzită mereu la flacără, se transferă obiectele din vasele cu parafină din termostat, așezându-le distanțat sau grupat pe fundul vasului, corespunzător cu direcția de secționare. Astfel dacă intenționăm să facem secțiuni transversale prin obiectele incluse (rădăcini, ramuri, tulpini etc.), acestea se așază orizontal în vasul de includere. Această operațiune trebuie însă să aibă loc rapid pentru ca parafina să nu se solidifice între timp.

Se mai trece după aceea cu pensa încălzită de câteva ori în jurul obiectelor, pentru a topi complet parafina și a înlătura eventualele bule de aer care s-ar forma la introducerea obiectelor.

După introducerea obiectelor în băiță cu parafină, aceasta se așază pe o placă metalică rece sau chiar pe masa de laborator astfel ca, pe fundul vasului, parafina să se și solidifice. Apoi se suflă ușor peste suprafața parafinei încă lichide, pînă ce aceasta începe să se solidifice, formîndu-se o peliculă pe întreaga suprafață a băiței. Se ia după aceea cu două degete vasul de pe masă și se introduce cu partea bazală și cca $1/2$ din înălțimea marginilor lui, într-un cristalizor cu apă rece de robinet. Vara, cînd temperatura camerei este ridicată, se adaugă în apa din cristalizor cîteva cuburi de gheață. Pentru ca pelicula de parafină să se solidifice cît mai repede, se picură puțină apă rece deasupra ei și numai după aceea se scufundă complet vasul cu parafină în apa din cristalizor. În același timp se netezește ușor cu degetul suprafața parafinei sub apă, exercitînd o ușoară presiune asupra acesteia, în vederea înlăturării oricăror bule de aer.

Se trece după aceea cristalizorul cu băiță cu parafină sub un robinet și se lasă cîteva minute să curgă

deasupra acesteia un jet slab de apă rece pînă la întărirea (solidificarea) completă a parafinei. Dacă vasul a fost bine uns cu glicerină și dacă apa a fost rece, după cîteva minute blocul se desprinde din vasul de includere, plutind la suprafața apei. Dacă desprinderea nu se face de la sine, atunci se scoate vasul din apă și cu ajutorul unei pense sau al unui ac spatulat desprindem blocul din vas, introducînd pensa sau acul spatulat la colțurile blocului între vas și parafină. Dacă la includerea în parafină s-au folosit colțare pentru turnarea blocurilor, atunci după întărirea parafinei se scot clemele și se îndepărtează între ele colțarele. Vasele confecționate din hîrtie de desen sau din folie de aluminiu se depliază după întărirea blocului.

Notările necesare ca : denumirea obiectelor incluse, data includerii ș.a., se pot înscrie cu vîrfuț unui creion mai dur și bine ascuțit sau cu un ac, pe fața dorsală a blocului.

Blocurile de parafină cu obiectele incluse în ele pot fi păstrate timp nelimitat, ferindu-le însă de o încălzire excesivă și așezîndu-le în plicuri etichetate pînă în momentul secționării.

Un bloc de parafină omogenă se taie în general bine cînd nu este opac sau străbătut de dungî albicioase sau de bule de aer, ci are un aspect sticlos-translucid. Blocurile „albe ca zăpada” conțin de obicei diverse impurități, substanțe intermediare ș.a. și nu se secționează bine.

2.2.1.9. INCLUDEREA ÎN PARAFINĂ DUPĂ LIOFILIZAREA OBIECTELOR

În majoritatea cazurilor, împarafinarea se face după una din metodele prezentate anterior, adică mai întîi obiectele sînt deshidratate în alcool sau în alte li-

chide, apoi sînt clarificate și în final sînt impregnate cu parafină.

Impregnarea cu parafină se poate face și cu material liofilizat, adică deshidratat prin frig, ceea ce necesită însă aparate speciale.

Avantajul acestei metode constă în faptul că obiectele, în afară de parafina lichidă și eventual a unui mediu de răcire, nu mai vin în contact cu alt lichid, ceea ce este foarte important mai ales în cercetările histochimice și în cele pentru autoradiografie. De asemenea, pentru cercetările citologice, liofilizarea prezintă unele avantaje față de metodele uzuale aplicate înainte de împarafinare, deoarece, în acest caz, contracțiile care au loc la nivel celular sînt mult reduse la materialele foarte sensibile.

Efectuarea unei asemenea impregnări cu parafină necesită însă un aparat special, a cărui folosire rezultă din instrucțiunile respective.

La includerea în parafină după liofilizare se folosesc totdeauna materiale proaspete, nefiind necesară fixarea acestora. Obiectele pot fi congelate pe platoul aparatului, însă aceasta durează prea mult, astfel că între timp în celule se pot forma cristale de gheață care produc artefacte. Acest inconvenient se poate evita dacă obiectul este adus rapid la temperatura azotului lichid, prin scufundarea acestuia într-un lichid tot atît de rece, de exemplu în freon. Materialul rece se așază într-o capsulă de metal pusă pe platoul aparatului de liofilizare și în aceeași capsulă se adaugă o bucată de parafină, iar lîngă platoul aparatului se mai pune o capsulă cu pentaoxid de fosfor ca deshidrant. La aceasta din urmă se poate renunța în cazul folosirii unor aparate la care se lucrează cu pompe de vid speciale (de exemplu aparatul Leybold-Heraeus).

După ce s-a așezat pe aparat un clopot de sticlă destul de gros, se pornește instalația de răcire și pompa de vid, începîndu-se liofilizarea. Aceasta are o durată variabilă, în funcție de natura și mărimea obiectului și ea trebuie stabilită experimental. În general, liofilizarea are loc cu atît mai repede cu cît vidul este mai avansat și cu cît temperatura din aparat este mai scăzută. Temperatura nu trebuie să fie mai mare de -40° , -35° , deoarece duce la cristalizarea apei din celule. De aceea, cel mai bine este să se lucreze la temperaturi mai mici (-50° și chiar mai joasă).

Încheierea procesului de liofilizare nu se poate cunoaște după aspecte exterioare, ci trebuie stabilită timpilor respectivi prin probe preliminare.

Cînd obiectele sînt uscate se impregnează cu parafină. Pentru aceasta se trece la încălzirea platoului aparatului, pînă cînd parafina din capsula de lîngă material se topește.

În vid, impregnarea se face repede și se termină la majoritatea obiectelor botanice în 30 minute pînă la o oră. După aceea, blocul este lăsat să se întărească și se secționează ca orice bloc obișnuit.

2.2.2. INCLUDEREA ÎN ALTE MEDII

În afară de metoda clasică de includere în parafină a materialelor vegetale, în tehnica microscopică modernă sînt utilizate și alte medii de includere corespunzător cu natura obiectelor ce urmează a fi incluse în vederea cercetării.

În continuare, prezentăm, în ordinea folosirii lor, cele mai importante medii de includere și metodele de lucru corespunzătoare.

2.2.2.1. INCLUDEREA ÎN CELOIDINA

Metoda includerii în celoidină este folosită cu rezultate foarte bune pentru diferite materiale biologice vegetale cu duritate mare sau foarte fragile și friabile. Parafina nu oferă un material adecvat pentru secționarea unor astfel de obiecte, deoarece necesită temperaturi ridicate, ceea ce face ca obiectele să se contracte, să devină fragile sau să sufere alte modificări.

Materialele care se pot secționa cu ajutorul acestei metode sînt numeroase: locul de unire al altoiului pe portaltoi, în care componentele incomplet sudate trebuie mereu ținute intacte înainte și după secționare, materiale fitopatologice care pot fi într-o astfel de stare de dezintegrare și de fragilitate încît s-ar putea desface fără mediul de celoidină, sectoare din structurile primare și secundare care conțin lemn, cambiu, liber și țesuturile scoarței, pot fi menținute nedeformate numai prin această metodă, ramuri tinere și vîrfuri vegetative pot fi foarte bine orientate și secționate în orice plan etc.

Celoidina este mediul de includere care pătrunde cel mai ușor în obiectul inclus, ea nu modifică țesuturile și de aceea este larg utilizată. Obiectele astfel incluse pot fi ușor orientate și secționate uniform, obținîndu-se numeroase preparate. În unele laboratoare, metoda includerii în celoidină este neglijată, dar cele indicate mai sus arată că această metodă își are locul său în orice laborator bine dotat și cu multiple preocupări.

Substanța folosită în această metodă este un dintrat de celuloză, cunoscută sub diferite denumiri comerciale: celoidină, parlodium și alte cîteva mai puțin folosite. Este o substanță inflamabilă și explozibilă, deci trebuie manipulată la adăpost de surse de foc.

Acest produs se află în comerț sub formă de fișii sau bucăți flexibile și translucide, în cutii metalice închise ermetic. Pentru folosire, celoidina trebuie în prealabil să fie adusă în stare anhidră. În acest scop plăcile de celoidină se taie în bucăți mici, și se pun pe hîrtie de filtru în termostat la 37°C sau pot fi uscate la temperatura camerei, în loc ferit de umezeală și foc. După această operație, celoidina se dizolvă. Solventul celoidinei cel mai frecvent utilizat constă într-un amestec de volume egale de alcool etilic absolut și eter (1 : 1), care trebuie să fie de bună calitate și anhidri.

Pentru obținerea unor blocuri de celoidină mai dure, la dizolvarea acesteia se folosește amestecul alcool-eter nu în proporții egale, ci de 1 : 1,5 sau chiar 1 : 2. O astfel de soluție de celoidină este foarte bună pentru montarea materialelor biologice vegetale în care predomină țesuturile parenchimatice cu mari spații intercelulare.

Este preferabil să se folosească reactivi procurați din comerț, dar se pot prepara și în laborator.

Prepararea eterului absolut se face cu sulfat de cupru sau cu CaO (var nestins). Sulfatul de cupru se adaugă în proporție de 50 părți pentru 800 părți eter. Atît sulfatul de cupru cît și varul nestins sînt cufundate în eter, după ce în prealabil au fost introduse în pungi de hîrtie de filtru, legate.

Celosolv este numele comercial a 2 compuși organici sintetici, eterul monoetilic al etilen glicolului și omologul său metilic. Aceste lichide sînt solvenți ai celoidinei și vor înlocui probabil amestecul alcool-eter folosit pînă acum. Acești solvenți nu sînt inflamabili la temperatură obișnuită de lucru și de aceea întregul proces poate fi executat în flacoane deschise sau ușor astupate. Evaporarea are loc la $50\text{--}55^{\circ}\text{C}$. *Metil-celosolv*, care fierbe la $124,3^{\circ}\text{C}$, se evaporă ceva mai

repede decât etil-celosolv, care fierbe la $135,1^{\circ}\text{C}$. Solventul din urmă este preferabil pentru materialele fragile care tind să se deformeze sau chiar să se rupă când concentrația celoidinei este mărită prea repede.

Celosolvul poate fi utilizat și ca agent deshidrant. Materialele în care nu trebuie menținut protoplastul pot fi transferate după fixare și spălare direct în celosolv, care se va schimba de 2—3 ori înainte de începerea impregnării. Dacă însă materialul cere deshidratare completă sau treptată, pentru a asigura aderența celoidinei, atunci este mai bine a face deshidratarea în alcool etilic sau acetonă și celosolvul să fie folosit numai ca solvent pentru impregnare.

Deși solventii amintiți mai sus au fost mult folosiți, îndeosebi amestecul alcool-eter, acesta face însă dificilă întărirea blocurilor pentru a realiza secțiuni sub $10\ \mu$. De aceea, în prezent se folosește un alt procedeu, al lui Nultsch, în care este utilizat tetrahidrofuranul ca solvent. Astfel, se obțin blocuri care pot fi secționate la $5\ \mu$ și chiar sub această grosime.

Materialele vegetale care urmează a fi incluse vor fi mai întâi fixate în fixatori specifici, în funcție de particularitățile acestora. Urmează spălarea fixatorului, la fel cum se procedează și pentru metoda împarafinării.

O bună includere în celoidină este determinată în primul rând de deshidratarea completă a obiectelor, aceasta fiind necesară deoarece celoidina nu este miscibilă cu apa. Pentru deshidratare se folosește seria crescândă de alcool pînă la alcool etilic absolut sau se pot efectua trei băi succesive de alcool absolut. În acest caz materialele trebuie ținute în borcane perfect închise cu dopuri rodade, iar cantitatea de alcool să fie de 10—15 ori mai mare decât volumul acestora. Obiectele se lasă în alcool în funcție de mărimea lor,

de la 5—6 ore pentru cele de 0,5—1 mm, pînă la 12—16 ore pentru cele mai mari. De asemenea, o bună deshidratare se poate obține și cu tetrahidrofuran (după metoda lui N u l t s c h).

Pentru includerea în celoidină se folosesc în mod obișnuit cinci soluții de 2, 4, 6, 8 sau 10 g celoidină la 100 ml de solvent. Cînd se folosesc ca solvenți alcoolul absolut și eterul, se procedează în felul următor pentru obținerea *soluției de celoidină 2%*: se pun 20 g de celoidină uscată în 500 ml alcool etilic absolut și se lasă într-o sticlă perfect închisă timp de 24 ore, agitîndu-se din cînd în cînd, după care se adaugă 500 ml eter anhidru. Celoidina se dizolvă astfel foarte repede. Flaconul în care se află soluția se va agita în continuare, întorcîndu-se chiar și cu dopul în jos. Procedînd astfel, dizolvarea are loc mai repede decît dacă se pune celoidina de la început în amestecul alcool-eter 1 : 1. Dar chiar și în acest caz, dizolvarea are loc în cîteva zile, deci se recomandă să se prepare odată o cantitate mai mare de soluție de celoidină care se va păstra în borcane cu gîtul lung și îngust, închise cu dop rodat. În mod analog se procedează și la obținerea celorlalte soluții. Se mai recomandă ca vasele cu soluțiile de celoidină să fie ținute într-un exicator cu Cl_2Ca , pentru crearea unei atmosfere anhidre. În mod asemănător se procedează pentru obținerea soluțiilor de celoidină și în cazul în care se folosesc ceilalți solvenți amintiți.

Includerea propriu-zisă. Metoda includerii în celoidină constă în introducerea obiectelor în prealabil fixate și deshidratate — într-o soluție diluată de celoidină, apoi în soluții din ce în ce mai concentrate și în final, în formarea de blocuri de celoidină solidificată ce conțin materialul biologic vegetal.

Solidificarea celoidinei se poate obține prin unul din următoarele procedee :

1. trecerea materialului printr-o serie de soluții de celoidină în concentrații crescute ;
2. adăugarea de bucăți de celoidină uscată, la anumite intervale, în soluția inițială de 2‰ ;
3. evaporarea solventului dintr-un volum mare de soluție de 2‰ ;
4. trecerea materialului prin soluții crescînde pînă la 8‰ ; apoi solidificarea celoidinei în prezența vaporilor de cloroform, alcool de 70‰ sau acid sulfuric.

1. Se trec obiectele deshidratate în 3 băi de solvent (alcool absolut+eter absolut 1:1). Aceasta are ca scop perfecta lor deshidratare, cît și degresarea lor. Celoidina este greu miscibilă cu grăsimile, așa încît se va căuta ca acestea să fie cît mai bine îndepărtate. Obiectele se țin în fiecare baie una sau cîteva ore. Se trec apoi în celoidină 2‰, acoperind materialul cu un volum de cel puțin cinci ori mai mare decît al acestuia. Se acoperă vasul cu un dop de plută uscat, pe care îl fixăm cu ajutorul unui lat de sîrmă (fig. 5 b). Se trece vasul în termostat la 53° C, unde se lasă un timp în funcție de natura materialului. Pentru fragmente de ramuri ale căror diametre nu depășesc 3—5 mm, este suficientă o durată de 24 ore. Pentru obiectele mai mari sau pentru materialele mai dense, timpul va fi de 48 ore sau chiar mai mult. După scoaterea din termostat, se lasă flaconul să se răcească și se răstoarnă soluția de celoidină 2‰ într-un vas metalic uscat (nu se răstoarnă în canal fiind inflamabilă). Se adaugă peste acest material soluție de celoidină 4‰, se acoperă flaconul și se menține același interval de timp în termostat la aceeași temperatură. Se face aceeași operație și cu concentrațiile de celoidină de 6‰, 8‰ și 10‰.

După ultima concentrație (10%) continuăm să mărim concentrația de celoidină, prin adăugarea în soluția de 10% a cîte unei bucăți de celoidină încît se poate solidifica la temperatura camerei, materialul fiind astfel gata pentru a fi inclus. Stabilirea momentului cînd celoidina a ajuns la consistența optimă pentru a obține blocurile constă în cufundarea unui băț de chibrit în celoidină, care apoi se introduce în cloroform timp de o oră. Celoidina trebuie să se solidifice într-o masă clară, compactă, încît să poată fi secționată cu ușurință cu briciul. Compararea eșantioanelor ce se iau va indica creșterea progresivă a consistenței celoidinei.

2. În alt caz, materialul vegetal se ține 48 de ore în soluție de celoidină 2%, într-un vas bine închis, în termostat. Apoi, la intervale de cîteva zile, vasul se răcește, se deschide și se adaugă o bucată de celoidină uscată, după care se pune din nou în termostat. Dacă materialul ce urmează a fi inclus este fragil, celoidina uscată se pune într-o pungă de tifon, care se introduce în vasul cu soluția de celoidină, astfel încît aceasta să se răspîndească treptat în soluția respectivă (fig. 5 c). Adăugarea de celoidină se continuă pînă cînd soluția are consistența necesară. Verificarea se face așa cum s-a descris la metoda 1.

3. O altă variantă este de lungă durată, dar produce rezultate superioare. Materialul este pus la început într-un vas mare cu celoidină 2%, care trebuie să depășească de cel puțin 4 ori volumul materialului, marcîndu-se nivelul inițial al soluției. Se acoperă sticla cu un dop ce este legat în așa fel încît să nu poată sări fără ca sticla să fie perfect închisă. Se ține sticla într-un loc cald, departe de vreo sursă de foc. În acest fel are loc o evaporare lentă, iar cînd volumul inițial ajunge la jumătate, soluția este aproximativ de 4%. Se adaugă soluție nouă de celoidină 4%, pînă la nivelul inițial.



Fig. 5 — Includerea materialului vegetal în celoidină :
 a — flacon special ; b — modul de legare al dopului ;
 c — scufundarea săculețului cu celoidină pentru mărirea concentrației soluției

Dacă soluția se colorează, se înlocuiește cu o nouă soluție de celoidină 40%. Se continuă procesul de evaporare lentă, pînă cînd materialul se găsește într-o celoidină vîscoasă, necesară formării blocurilor.

Wall s G. L. (1963) consideră că această metodă prezintă inconvenientul că unul din componentele mediului — și anume eterul — se evaporă în cantitate mai mare decît alcoolul absolut și astfel jeleul de celoidină se obține înainte de o îngroșare adecvată. Autorul propune pentru remedierea acestei deficiențe, adăugarea unei mici cantități de eter absolut.

Davenport H. H. și Swank R. L., 1934, precum și Koneff și Lyons, 1937, recomandă, pentru materialul dur, celoidină cu vîscozitate crescută. Această celoidină formează un mediu dur și soluțiile sale în alcool-eter (1 : 1) permit un procent de 60% apă, care diminuează fragilitatea extremă produsă asupra materialelor lemnoase în cursul hidratării complete.

4. După ultima metodă, materialul de inclus este trecut prin soluții de celoidină cu concentrație crescândă, 20%, 40%, 60%, apoi este trecut în vase speciale în soluție de celoidină 80%. Se folosesc vase cu contur circular sau pătrate, înalte de 4—5 cm și care să aibă marginile cu câțiva cm mai mari decât latura obiectului de inclus. Soluția de celoidină trebuie să depășească obiectul cu 2—3 cm, deoarece aceasta, prin evaporarea alcoolului și eterului (solventului), își micșorează aproape la jumătate volumul. Adăusul ulterior de soluție de celoidină nu este posibil, deoarece nu face masă continuă cu celoidina deja întărită.

Vasele cu soluția de celoidină și obiectele de inclus se pun într-un exicator în care există un vas cu acid sulfuric. Mărimea exicatorului, precum și cantitatea de acid sulfuric, vor fi direct proporționale cu mărimea obiectelor de inclus. Cu cât suprafața stratului de acid sulfuric va fi mai mare, cu atât procesul de întărire al celoidinei este mai rapid și deci se poate obține o îngroșare neuniformă, nesatisfăcătoare.

Vasele sînt lăsate în exicator 1—4 zile, pînă ce soluția de celoidină și-a redus volumul aproximativ la jumătate — prin evaporarea alcoolului și eterului în care era dizolvată — întărindu-se și căpătînd o consistență cartilaginoasă, care indică momentul solidificării acesteia.

Dacă la scurt timp după introducerea vasului în exicator se constată că s-a format la suprafață o crustă, înseamnă că celoidina nu este complet anhidră, ceea ce va crea greutate la secționare.

De asemenea, pentru a permite îngroșarea straturilor inferioare și pentru a evita formarea de cavități în masa de celoidină, se va detașa — cu ajutorul unui cuțit — stratul mai întărit de la suprafața celoidinei.

Dacă în timpul întăririi celoidinei apar bule de aer, se adaugă în aceasta cîteva picături din amestecul de alcool-eter 1 : 1 și se acoperă vasul, lăsîndu-l astfel timp de 30 minute. În felul acesta, celoidina se va înmuia, bulele de aer se vor ridica la suprafață, iar pentru o mai bună eliminare a acestora, vor fi înțepate cu un ac.

Este foarte importantă obținerea unei bune solidificări a celoidinei, deoarece numai astfel obiectele sînt bine pătrunse de celoidină și vor avea o consistență omogenă în toată grosimea lor, condiție fundamentală pentru buna lor secționare.

Pentru solidificarea masei de celoidină, se pune vasul de includere (după întărirea celoidinei prin reducerea volumului ei la jumătate) într-o cutie de sticlă cu capac, pe fundul căreia se toarnă un strat subțire de alcool 70%. Se lasă cîteva ore, pînă cînd, sub influența alcoolului, se produce o crustă la suprafața celoidinei și în același timp are loc și o scădere a volumului acesteia. Apoi, se umple vasul cu celoidină cu alcool 70%, care va extrage restul de alcool absolut din blocul de celoidină, ducînd la întărirea ei. După 24 ore, celoidina va fi atît de tare încît se poate desprinde ușor și poate fi scoasă din vas. În cazul în care celoidina nu s-a întărit complet, solidificarea poate continua cîteva zile, după scoaterea din vas, prin cufundarea acesteia cu materialul inclus în alcool 70%.

Celoidina cu materialele incluse pot fi păstrate timp nelimitat, în vederea secționării, în alcool 70% sau într-un amestec de alcool 70% și glicerină 2 : 1 sau într-un amestec de alcool 95% și glicerină 1 : 1.

Pentru solidificarea celoidinei se poate folosi acidul sulfuric, alcoolul, așa cum s-a menționat, dar poate fi folosit și cloroformul. Acesta din urmă poate fi folosit fie prin scufundarea în cloroform a materialului bio-

logic înconjurat de celoidină vîscoasă (obținut după metodele 1—3) și ținut 24 ore, fie, atunci cînd materialul biologic din celoidină se găsește în vase de includere, acestea se pun sub un clopot de sticlă sub care se așază și un vas descoperit cu cloroform. Vaporii de cloroform întăresc celoidina în 1—2 zile. Această metodă de întărire a celoidinei prezintă însă dezavantajul de a produce uneori tulburarea celoidinei, influențînd nefavorabil secționarea blocurilor și calitatea secțiunilor.

De asemenea, în lipsa exicatoarelor, se pot folosi simple clopote de sticlă, sub care se introduc vasele de includere în prezența unei cantități de var nestins. Clopotul se ridică din cînd în cînd, pentru a se îndepărta vaporii. Cu acest procedeu, solidificarea celoidinei durează între 5 și 6 zile. Blocurile se modelează cu ajutorul unui cuțit îngust și bine ascuțit, astfel încît în jurul obiectului să rămîna un cadru subțire de celoidină.

Suporturile pe care se vor monta blocurile pot avea forme și mărimi diferite, de asemenea, ele pot fi confecționate din material plastic sau lemn. Astfel, materialul lemnos ce urmează să fie secționat (îndeosebi ramuri) se va monta pe suporturi de lemn prevăzute cu un șanț longitudinal (fig. 6 a-c). Aceasta pot fi plate, iar pe suprafața lor, de fixarea blocurilor, se află striuri paralele pentru mărirea aderenței (fig. 7). Aceste suporturi trebuie făcute dintr-un lemn care să conțină cît mai puține rășini, de exemplu din lemn de mesteacăn. De asemenea, suporturile trebuie prelucrate, pentru a se extrage taninul, deoarece acesta se dizolvă în alcool de 70%, unde sînt ținute obiectele pînă la secționare, colorînd celoidina. Aceste suporturi de lemn vor fi fierte cîteva ore în apă cu hidrat de sodiu 2%, după care sînt ținute cîteva săptămîni sau luni în alcool de

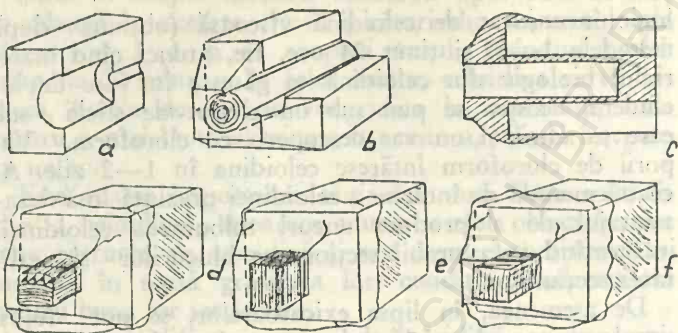


Fig. 6 — Tehnica de montare pe suporturi a blocurilor de celoidină :

a — suport de lemn cu șanț longitudinal pentru fixarea obiectelor lungi ; b, c — suporturi de lemn cu ramuri fixate în celoidină ; d—f — suporturi de lemn cu fragmente de material lemnos inclus în celoidină în vederea efectuării secțiunilor transversale, tangențiale și radiale (după Gherlach D.)

80—95%, acesta fiind schimbat de câteva ori, pînă ce nu se mai colorează, după care suporturile se scot și se usucă la aer.

Suporturile de lemn astfel prelucrate trebuie să fie perfect uscate, iar blocurile de celoidină, după ce au fost scoase din alcool 70% sau amestecul de alcool-glicerină, trebuie uscate cu grijă pe hîrtie de filtru, apoi zvîntate la aer 10—15 minute, altfel aderența lor pe suport va fi foarte slabă.

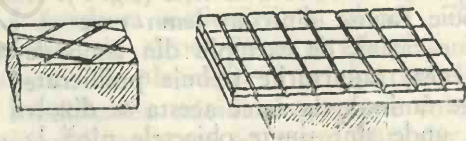


Fig. 7 — Suporturi de lemn cu șanțuri pe care se fixează blocurile de celoidină în care au fost incluse materialele biologice vegetale (după Gherlach)

Blocurile de celoidină se scufundă apoi timp de 1—2 minute într-o soluție de celoidină 8%, se scot și se așază pe suport, pe care s-au pus 2—3 picături din aceeași soluție de celoidină, se apasă ușor, astfel încât celoidina să pătrundă în șanțurile suportului. Se lasă apoi la aer 10—15 minute.

Blocurile se vor prinde și mai bine de suportul de lemn dacă înaintea scufundării lor în soluția de celoidină 8% sînt puse într-un amestec de alcool-eter timp de 30—60 secunde. În acest fel, stratul superficial de celoidină se înmoaie și se dizolvă puțin, devenind mult mai aderent la suprafața suportului de lemn pe care va fi montat.

După lipirea blocurilor pe suporturi, acestea se introduc în alcool de 70%, unde se lasă 3—6 ore, timp în care celoidina se întărește puternic, fixându-se perfect de suport.

Dubla includere în celoidină-parafină

Includerea dublă constă în impregnarea și includerea materialelor biologice în celoidină și apoi impregnarea lor cu parafină. Acest procedeu este folosit la studiul materialelor ce cuprind țesuturi dure alături de țesuturi foarte slabe și fragile, care din cauza contractării prea puternice a acestora nu pot fi incluse în parafină. În același timp nu este indicată nici includerea în celoidină, deoarece aceasta nu permite secționarea materialului vegetal sub formă de secțiuni foarte fine (de câțiva microni) și nici obținerea secțiunilor în serie.

Substanțele utilizate în dubla includere în celoidină și parafină sînt cele descrise la prezentarea metodelor de includere în parafină și respectiv în celoidină.

La efectuarea acestei duble includeri se procedează astfel: după spălarea obiectelor de fixator, acestea sînt

incluse în celoidină, conform metodei indicate, și turnate în blocuri de celoidină; aceste blocuri în prezența cloroformului se întăresc, după care sînt cufundate în cloroform timp de 24—36 ore, pentru a se realiza o bună îmbibare a acestora cu un lichid miscibil cu parafina. Se recomandă schimbarea de cîteva ori a cloroformului, pentru a se elimina solventul celoidinei. Blocurile se trec apoi în parafină la cald, la o temperatură de 53—54°C, în care sînt ținute între 20 și 36 ore, în funcție de mărimea blocului, pentru îmbibarea acestuia cu parafină; se scoate apoi blocul și se montează în parafină sau se răcește ca atare.

După răcire, blocul a căpătat o consistență mărită, beneficiind astfel de avantajele pe care le conferă includerea în celoidină. Blocul obținut poate fi secționat, asemănător celor incluse în parafină, cu ajutorul microtomului cu șină sau a celui rotativ. Prelucrarea secțiunilor pentru obținerea preparatelor durabile (fixe) se face la fel ca pentru secțiunile obiectelor incluse în parafină.

2.2.2.2. INCLUDEREA ÎN GELATINĂ

Această metodă este indicată pentru materialele vegetale care nu suportă temperaturi ridicate și ca atare nu pot fi incluse în parafină sau cele care sînt prea dense pentru a putea fi incluse în celoidină (de exemplu unele meristeme), precum și cele care nu pot fi secționate nici prin metoda congelării din cauza friabilității lor (de exemplu mugurii). Deoarece includerea în gelatină nu mai necesită nici un fel de deshidratare a obiectelor, materialele vegetale pot fi incluse în gelatină imediat după fixare și spălarea fixatorului, încît se suprimă tratarea acestora cu alcool sau alte substanțe care dizolvă grăsimile. În felul acesta sînt evi-

tate în bună parte contracțiile țesuturilor și multe substanțe pe care le conțin, în special lipidele, se mențin mult mai bine decât după alte metode de includere.

Cu toate acestea, includerea obiectelor în gelatină se folosește în mod excepțional, deoarece numai posedând multă experiență se pot obține din blocul de gelatină secțiuni mai subțiri de 10—15 μ . Apoi, blocurile trebuie clarificate prin frig, ele fiind secționate cu un microtom congelator. În prezent, includerea în gelatină se aplică numai atunci când secțiunile congelate se dezagregă dacă nu sînt incluse (de exemplu, mugurii). Este totuși posibilă efectuarea seriilor complete de secțiuni, dacă microtomul congelator este prevăzut cu o instalație electrică de răcire.

Conservarea picăturilor de grăsime în celule se realizează prin fixarea obiectelor vegetale cu formol diluat în care se și pot conserva. Înainte de a trece la includere, formolul din obiecte trebuie spălat cu un jet slab de apă de robinet sau aceasta trebuie schimbată des pînă la eliminarea oricăror urme de formol, care ar precipita gelatina din soluție.

Se folosește gelatină de bună calitate, adică cea care se prezintă sub formă de foi. Se prepară 3 soluții de concentrație crescîndă de gelatină în apă distilată: prima soluție de 5%, a doua de 12% și a treia de 25%. În fiecare soluție se adaugă 1% fenol. Pentru a se mări elasticitatea gelatinei, în soluția de 25% se adaugă 10% glicerină. Prepararea soluțiilor se face la 37°C, cu puțin timp înaintea utilizării și sînt păstrate în borcane cu dop rodat, pentru a se împiedica evaporarea apei.

Includerea obiectelor în gelatină se face la cald la 37°C, într-un termostat. Materialul este fixat înainte într-unul din fixatorii cunoscuți, în funcție de natura materialului sau a scopului urmărit; se spală apoi în

apă de robinet, la jet continuu, timp de 18—24 ore ; se trec apoi obiectele în soluția de gelatină 5%, în care vor fi ținute 14—16 ore, apoi sînt transferate în soluția de 12%, timp de 16—24 ore și în cele din urmă în soluția de 25%, în care se lasă timp de 2—3 zile.

Din ultima soluție de gelatină, obiectele sînt trecute în vase mici, în care se găsește soluție concentrată de gelatină 25%. Se lasă astfel puțin timp, apoi vasele se trec la rece. După ce gelatina s-a întărit, se scot blocurile din vase și se scufundă într-o soluție de formol 20%, în care se țin 3—6 ore, pentru a se mări solidificarea. Blocurile astfel întărite pot fi păstrate mai mult timp într-o soluție de formol 10%.

După o altă metodă (G e r l a c h D., 1977), pentru includerea materialelor vegetale în gelatină sînt necesare două soluții de gelatină în apă : de 12% și de 25%, la care se adaugă un cristal de timol sau puțin fenol, pentru a împiedica formarea mucegaiurilor.

Gelatina se dizolvă la 60°C, evitîndu-se o temperatură mai ridicată, deoarece altfel gelatina nu se mai întărește. Dizolvarea gelatinei durează cîteva zile.

După fixare și spălare, obiectele se trec din apă direct în soluția de 12% gelatină, care se află în termostaț la 40°C urmărindu-se, ca și la împarafinare, menținerea unei temperaturi cît mai constante. După ce obiectele au stat în această primă soluție de gelatină 12—24 ore, se introduc pentru 12—24 ore în soluția de gelatină de 25% la 40°C. Apoi, obiectele se pun într-o cutiuță pliată din folie de aluminiu și peste ele se toarnă soluție de gelatină de 25%. Imediat după aceea se orientează obiectele cu un ac ușor încălzit și apoi se lasă gelatina să se întărească.

Pentru aceasta, cutiuța de includere se introduce în frigider unde, după 30 minute, blocul devine destul de tare pentru a fi ajustat cu o lamă de ras.

Acesta este lăsat să se usuce la aer, unde se întărește în continuare. În această stare, el este uscat corespunzător și poate fi lăsat mai departe la aer pînă ajunge la consistența unei gume de șters.

Pentru întărirea definitivă a blocurilor, acestea se introduc, timp de 2—3 zile, în formol în apă 4^o/. După aceea, se secționează cu microtomul congelator sau în caz de o întărire bună, cu microtomul cu sanie.

2.2.2.3. INCLUDEREA ÎN POLIETILENGLICOL

Unul dintre mediile de includere mai recent utilizate este *polietilenglicolul* sau *poliglicolul*. Acesta este comercializat cu grade de polimerizare diferite. Gradele inferioare de polimerizare a polietilenglicolului au consistență uleioasă, așa cum este poliglicol 500, în timp ce tipurile de poliglicol 1 000, 1 500 și 2 000 (Hoechst) sînt solide, densitatea lor crescînd odată cu greutatea moleculară. Pentru scopuri microtehnice se folosește mai mult poliglicolul 1 500.

Această metodă de includere prezintă avantajul că nu necesită deshidratarea cu alcooli sau cu alți solvenți ai grăsimilor și astfel lipidele se mențin în celule. Impregnarea cu poliglicol necesită însă, ca și la împarafinare, acțiunea căldurii, încît contracțiile țesuturilor nu pot fi evitate în toate cazurile.

Deși includerea în poliglicol pare foarte simplă, totuși nu se obțin prea ușor blocuri bine secționabile, deoarece substanța de includere devine uneori atît de casantă, încît cu greu se pot obține secțiuni bune. Aceasta însă se poate înlătura adăugînd la poliglicol puțină glicerină. De asemenea, poliglicolul nu poate pătrunde în țesuturi dense cu spații intercelulare reduse.

Din cele arătate reiese că această metodă de includere nu poate fi considerată ca o metodă sigură, cum sînt metodele cu parafină și celoidină și de aceea se recomandă niște probe preliminare.

La includerea cu poliglicol se folosește un amestec de poliglicol cu glicerina. Pentru prepararea acestuia se adaugă la 20 g poliglicol 1 500, 0,5 ml glicerina, care se topesc împreună. Amestecul rezultat este higroscopic și de aceea trebuie păstrat într-un vas bine închis.

Modul de includere. Obiectele, fixate de preferat într-un mediu apos și bine spălate cu apă, se pun într-un pahar Berzelius de 100 ml, plin cu o soluție de poliglicol 1 500 în apă. Soluția se prepară la cald. Pe peretele exterior al paharului se marchează cu tuș nivelul acestuia, iar distanța pînă la fundul paharului se împarte în 5 părți egale. Paharul astfel marcat se lasă 3—4 zile într-un termostat reglat la 60°C, timp în care apa din soluție se evaporă. La început obiectele plutesc la suprafața soluției și se scufundă pe măsură ce se impregnează cu poliglicol.

Cînd soluția s-a îngroșat, rămînînd la 1/5 din volumul inițial, obiectele se trec într-un amestec topit de poliglicol 1 500 și glicerina, la o temperatură de 60° C, unde se lasă 12—24 ore.

După acest interval de timp se trece la formarea (turnarea) blocurilor. Pentru aceasta se umplu cutiute din folie de aluminiu, pliate în prealabil, cu acest amestec de poliglicol și glicerina. Apoi se introduc obiectele în acestea și poziția lor se potrivește cu ace spatulate. Se lasă aceste cutiute cu poliglicol la frigider ca să se întărească.

Întrucît poliglicolul este ușor higroscopic și capătă la aer o suprafață unsuroasă, se recomandă păstrarea blocurilor într-un borcan cu dop rodat.

În orice metodă de includere, obiectele trebuie trecute printr-un număr relativ mare de lichide, însă ele se află în sticlute, flacoane sau eprubete mici și se transferă cu ajutorul unei pense.

Transferarea dintr-o soluție în alta se poate face însă și cu aparate speciale pentru împarafinarea automată, cum sînt : Autotechnik, Jung, Shandon, WKE.

2.2.2.4. INCLUDEREA ÎN GUMĂ ARABICĂ

Este utilizată fiindcă nu necesită deshidratarea obiectului și nu produce nici modificări în structura acestuia.

Tehnica de lucru este simplă și constă în prepararea unei soluții de gumă arabică de consistență siropoasă, în care se așază obiectul ce urmează a fi pregătit pentru secționare. În această soluție, obiectul este lăsat pînă cînd se îmbibă complet.

Se trece apoi la prepararea bloculețelor, turnîndu-se soluția de gumă ce conține obiectele, în cutiute de hîrtie, după care acestea se introduc pentru cîteva zile în alcool de 80%. Masa de includere ținută în alcool de 80% capătă o consistență gelatinoasă, care permite secționarea ulterioară a obiectelor.

Scoaterea obiectelor sectionate din masa de incluziune se face după menținerea acestora timp de cîteva zile într-un vas cu apă ; în final obiectele se așază pe lame port-obiect.

2.2.2.5. INCLUDEREA OBIECTELOR FOARTE DURE

Obiectele foarte dure, de exemplu ; semințele, fragmentele de ramuri ale arborilor ș.a., pot fi incluse într-un aliaj metalic din plumb, cadmiu, cositor, bis-

mut și mercur, după o metodă propusă de Lutz. Fișile obținute prin tăiere cuprind secțiunile din obiectul vegetal care se detașează cu ușurință de masa metalică.

Corpurile tari și semințele uscate necesită aproape totdeauna o înmuiere. În acest sens, se recomandă un tratament cu 1/2 oră cu vaporii de apă sau menținerea lor în apă clocotită (1/2 oră), după care se introduc timp de 24 ore într-un amestec de alcool și glicerină, în părți egale.

Dacă ele conțin multe elemente minerale, se recomandă eliminarea acestora cu ajutorul acidului fluorhidric. În acest scop se introduce într-un vas de sticlă parafină topită, se rotește și se apleacă vasul cu grijă, astfel ca pereții să se acopere complet cu parafină, fără să se formeze goluri și se lasă să se întărească. Se introduce în vas o bucată de lemn sau sămînța ce urmează a fi secționată și se toarnă deasupra o soluție de acid fluorhidric de 10—15%. După vreo patru zile se scoate obiectul din acid, se spală, după care se secționează.

Koch recomandă pentru tratarea corpurilor de lemn, glicerină gumată în următoarea combinație :

gumă arabică	10 g
apă	10 ml
glicerină	40—50 picături
puțin fenol.	

Materialul proaspăt se fixează în alcool 70%. Apoi se trece în apă, aerul îndepărtându-se cu o pompă pneumatică. Se ia obiectul și se trece într-un amestec format dintr-o parte din soluția indicată mai sus și trei părți apă, unde va rămâne cca o săptămână; vasul fiind descoperit, soluția va deveni siropoasă. Apoi obiectul de secționat se scoate din amestec, se îndepăr-

tează guma aderentă, după care se face o secțiune care se lasă la uscat 4 zile. Abia atunci obiectul este bun de secționat. Secțiunea se lasă în apă la 50°C, unde guma va fi dizolvată. Sămînța uscată se trece apoi în ceară japoneză topită și ulterior se secționează împreună cu aceasta.

Același obiect se poate lăsa la uscare și în stearină topită, după următorul procedeu: se picură pe o sticlă plană, unsă în prealabil cu glicerină, atîta stearină încît să se formeze ca un vas de includere, în care se pune obiectul de la rece; se picură mai departe stearină deasupra acestuia, pînă la deplina includere a obiectului. Stearina se va tăia odată cu obiectul.

Secțiunea se ia cu un ac spatulat umectat mereu cu alcool, pentru ca să acționeze asupra stearinei; apoi secțiunea se trece în apă amoniacală, astfel ca să apară evidente țesuturile.

Această metodă este recomandată, de asemenea, pentru fragmentele de tal.

2.3. SECȚIONAREA LA MICROTOM A OBIECTELOR VEGETALE INCLUSE ÎN DIFERITE MEDII

După includerea obiectelor vegetale de studiu în diferite medii, blocurile obținute se păstrează în vederea efectuării secțiunilor la microtom.

O măsură necesară pentru păstrare este etichetarea blocurilor sau gravarea acestora cu ajutorul unui ac, menționîndu-se datele de identificare: numele plantei, organul (partea din acesta) inclus și data includerii. Păstrarea trebuie asigurată în locuri corespunzătoare în ceea ce privește temperatura, umiditatea, lumina etc.

2.3.1. SECȚIONAREA OBIECTELOR INCLUSE ÎN PARAFINĂ

Întrucît tehnica de efectuare a secțiunilor la microtom este aceeași, indiferent de mediul de includere, se va prezenta în primul rînd modul de lucru pentru obiectele incluse într-un bloc de parafină, mediul cel mai frecvent folosit în diverse cercetări.

Se disting două operații diferite și consecutive : *tăierea blocului și secționarea propriu-zisă*, după care urmează *montarea secțiunilor*.

La *tăierea blocului*, care constituie prima operație, se are în vedere că într-un bloc de parafină, de obicei, pot fi incluse mai multe fragmente din plantă și drept urmare se taie blocul mare în mai multe bloculețe mici, astfel ca fiecare din acestea să conțină numai un fragment care să fie acoperit din toate părțile cu parafină de cîtiva mm grosime.

Bloculețul detașat din blocul mai mare se fasonează cu ajutorul unui bisturiu foarte bine ascuțit, pentru a căpăta o formă cubică sau paralelipipedică, după forma obiectului inclus, avîndu-se grijă ca fețele obținute prin fasonare să fie netede și paralele între ele.

Observîndu-se, prin transparență, poziția fragmentului de plantă în bloculeț, se trece fațeta opusă celei spre care se află fragmentul (în cazul că nu este poziționat central) deasupra unei flăcări, într-o mișcare rapidă, pentru a produce o topire ușoară a parafinei, după care imediat se lipește prin apăsare de port-obiectul aparatului (microtomului).

Pentru asigurarea unei bune fixări se folosește și un ac spatulat, care se trece mereu prin flacără și cu ajutorul căruia se presează marginile încă mai aplicate pe port-obiect.

Poziția bloculețului la fixare pe port-obiect se alege de cercetător, în funcție de direcția de tăiere după

care se vor efectua secțiunile : longitudinală sau transversală și această poziționare este posibilă fiindcă obiectul se vede prin transparență în bloculețul de parafină ; dacă va fi lipit vertical, se obține o secționare transversală, iar dacă se așază orizontal, se face o secțiune longitudinală.

După așezarea bloculețului prin lipire pe port-obiect, se procedează la rectificarea fațetelor cu ajutorul bisturiului, avînd în vedere că prin ușoara încălzire și apoi presare au avut loc deformări. Scopul realizării acestor cerințe (marginile suprafeței de secționat să fie paralele între ele și paralele cu muchia briciului microtomului), este explicat de faptul că în această situație se obțin secțiuni succesive, paralele, deci de grosimi egale, iar marginile secțiunilor lipindu-se între ele capătă forma unei benzi. În cazul în care marginile suprafețelor de secționat nu sînt paralele, se obțin secțiuni cu laturi de grosimi diferite. Acestea nu se lipesc între ele în timpul secționării și drept urmare secțiunile pot sări de pe port-obiect, în afară de faptul, deosebit de important, că nu se obține o serie de secțiuni succesive și se pot pierde unele stadii intermediare.

Secționarea propriu-zisă începe cu pregătirea microtomului, ceea ce înseamnă fixarea port-obiectului la microtom, orientarea lui (folosind șuruburile de înclinație) ca să fie perfect paralelă cu lama cuțitului, respectiv unghiul de tăiere să fie egal cu 90° . Stabilirea grosimii secțiunilor care urmează a fi efectuate se realizează cu ajutorul roțiței gradate pe care sînt înscrise valorile micronilor.

Manipularea propriu-zisă a cuțitului microtomului se face în conformitate cu indicațiile date de constructor (învîrtirea roții microtomului la tipul Minot

sau mișcarea mânerului port-briciului la microtomul cu șină).

O operație foarte dificilă de care trebuie să se țină seama este cea privind alegerea corectă a unghiului de înclinație, ceea ce necesită executarea unor secțiuni de probă. Unghiul respectiv depinde de grosimea secțiunii, duritatea parafinei, natura obiectului, tipul cuțitului și temperatura camerei. Unghiul de înclinație are valoarea minimă când fața de jos a briciului este paralelă cu blocul. De obicei, briciul se fixează mai înclinat, astfel încât valoarea unghiului este ceva mai mare. În general, unghiul de înclinație a briciului este mai mic când se secționează obiecte mai moi și mai mare când obiectele sînt mai dure. O înclinare prea mare a tășului briciului produce vibrații pe bloculețul de parafină, iar o înclinație prea mică deformează secțiunile în sens tangențial.

După operațiunile enumerate urmează secționarea propriu-zisă, care constă în obținerea de secțiuni succesive prin materialul inclus, sub forma unei benzi sau panglici. Există posibilitatea de a se realiza un număr mare de secțiuni, ca o panglică, care se așază pe o hîrtie neagră în ordinea în care se obțin la microtom și apoi se fragmentează proporțional cu mărimea lamelei sau se realizează serii întrerupte de secțiuni atît cît este necesar pentru o lamelă.

Așezarea secțiunilor pe lamă se face prin prelevarea lor de pe lama briciului microtomului cu ajutorul unei pensule umectată în apă distilată. Apoi urmează așezarea acestora, în unul sau mai multe șiruri paralele în ordinea secționării, pe lama unsă în prealabil cu albumină glicerinată. Este important ca așezarea pe lamă să se facă strict în ordinea secționării la microtom, pentru ca la studiul microscopic să existe succesiunea firească a țesuturilor în organul studiat.

Este posibil ca numărul de secțiuni obținute să fie mai mare decât pot fi cuprinse pe o singură lamă; în acest caz se folosesc mai multe lame pe care se fac notările corespunzătoare pentru identificare (chiar numai prin simboluri); ele trebuie să corespundă cu cele din caietul de lucru, unde se înscriu și alte detalii.

2.3.2. ACCIDENTE IN EFECTUAREA SECȚIUNILOR

În timpul lucrului este posibil la microtom să nu se poată obține o bandă (panglică) continuă de secțiuni; aceasta fiind cauzată de neparalelismul fațetelor la bloculețele de parafină sau chiar din cauza parafinei însăși, care poate fi uscată și casantă. În primul caz se verifică paralelismul fațetelor, iar în al doilea, se încearcă înmuierea parafinei, care se poate realiza prin încălzirea sub un bec de lampă de masă sau chiar numai la temperatura ambiantă din camera de lucru. Dacă nu se obțin rezultate satisfăcătoare în acest mod, se vor face secțiuni de grosimi mai mari (dacă studiul permite) sau se vor repeta includerile într-o parafină de mai bună calitate.

În cazul în care are loc ruperea secțiunilor, aceasta se datorează fie parafinei prea uscate, fie că obiectul vegetal a fost ținut în fixator sau alcool absolut timp îndelungat, ori că bloculețul de parafină cu obiectul inclus a fost lăsat prea mult timp în termostată la o temperatură mai mare decât punctul de topire al parafinei.

Remediul în aceste situații nu este altul decât încălzirea camerei de lucru sau mărirea grosimii secțiunilor.

Mai este posibilă obținerea de secțiuni încrețite sau cu goluri în parafină; cauza este fie suprafața de secționare a bloculețului prea mare, fie că grosimea secțiunilor este prea mică și în acest caz remediul este încălzirea lentă a lamei sau mărirea grosimii de secționare. Descrețirea secțiunilor este posibilă dacă fragmentele de panglică se cufundă într-un vas cu apă caldă cu temperatura sub punctul de topire al parafinei. Imediat secțiunile se întind; și se introduce sub ele încet o lamă unsă cu albumină glicerinată (după P. Mayer), se ridică ușor ținând secțiunile cu un ac spatulat ca să nu alunece. Apoi lama cu secțiunile se pune la uscat, acestea rămânând astfel perfect întinse.

În ceea ce privește golurile din parafină în care este inclus obiectul vegetal, ele sînt datorate unei includeri nereușite, deci a unei împarafinări greșite. Acestea se remediază prin umplerea golurilor cu parafină topită sau, mai eficient, prin reîmparafinare.

2.3.3. LIPIREA SECȚIUNILOR PE LAMA

Odată obținute secțiunile prin obiectul vegetal înglobat în bloculețul de parafină, este necesară fixarea acestora pe lama care se folosește la studiul microscopic.

Lama, bine curățată de praf și degresată, este unsă cu albumină glicerinată (după P. Mayer), operație care constă în punerea unei picături de albumină glicerinată pe suprafața lamei și întinderea ei uniformă în lungul acesteia, prin frecarea ușoară a lamei cu un deget. Pe două din laturile lamei se pun 3—4 picături de apă distilată, care contribuie la întinderea secțiunilor și la orientarea lor. Se așază apoi secțiunile în ordinea obținută la microtom, începînd de la stînga spre dreapta, cu grijă ca acestea să fie în succesiunea

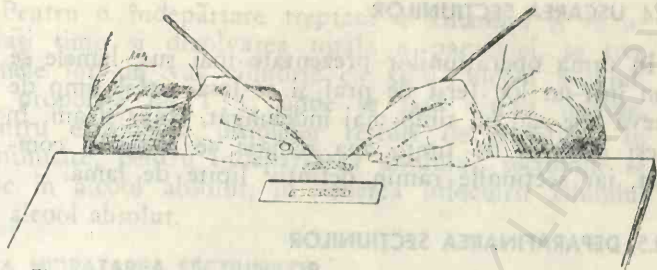


Fig. 8 — Așezarea secțiunilor microtomice seriate pe lama unsă cu albumină (original)

secționării lor, fiindcă, așa cum s-a mai spus, numai astfel se realizează studiul corect al structurii intime a materialului secționat. De asemenea, trebuie să fie orientate cu fața superioară în sus, care este mată, iar fața inferioară, care este lucioasă, să fie în contact cu apa de pe lamă. În această poziție, secțiunile se apropie unele de altele, pentru a nu rămîne spații între ele și pentru a se asigura acoperirea lor cu lamela (fig. 8). Se trece apoi lama printr-o flacăra nu prea mare, cu mișcări repezi, pentru a nu se produce topirea parafinei și a se obține astfel o întindere perfectă a secțiunilor și fixarea lor pe lamă, datorită evaporării apei și coagulării albuminei. Procesul de întindere se va opri în momentul în care secțiunile nu mai prezintă nici un fel de cute.

Dacă totuși nu se poate obține o bună etalare, cauzele pot fi următoarele: secțiuni prea subțiri, parafina prea moale, temperatura camerei prea ridicată sau briciul de la microtom prea tocit. Secțiunile care nu s-au întins complet nu se pot observa bine la microscop la mărimi mai mari; de asemenea, în timpul colorării și trecerii lor prin seria de alcool, ele se desprind de pe lamă.

2.3.4. USCAREA SECȚIUNILOR

În urma operațiunilor prezentate mai sus, lamele se pun într-un loc ferit de praf și se lasă astfel timp de câteva zile sau un timp mai îndelungat, chiar și ani. În acest interval de timp, apa rămasă se evaporă complet, iar secțiunile rămân definitiv lipite de lamă.

2.3.5. DEPARAFINAREA SECȚIUNILOR

Lamele care au fost uscate conțin secțiuni înconjurate de parafină, deci neclare pentru a fi analizate la microscop. Deparafinarea secțiunilor se face în felul următor: lama se trece printr-o flacăară pentru a se topi parafina, fără a se afecta secțiunea din materialul vegetal. După răcire, lama cu secțiuni se introduce într-un cilindru Borell sau alt vas cilindric acoperit, în care se află xilen sau toluen pentru deparafinat și în care se lasă timp de $1/2$ —2 ore, cât să dizolve parafina din jurul și din interiorul secțiunii; în acest fel se obține și o clarificare a preparatului.

De remarcat că pînă se introduc lamele în vasul cu xilen sau toluen, parafina se solidifică din nou după fuziune, dar aceasta nu împiedică cu nimic continuarea operațiilor deoarece odată topită, dizolvarea ei ulterioară se face mult mai ușor. Într-un cilindru Borell nu se pot introduce mai mult de 4 lame, care se așază două câte două spate în spate, iar perechile ce rămîn față în față cu secțiunile se îndepărtează, așezînd între ele un bețișor de chibrit. Cînd se lucrează cu mai multe lame se pot folosi 2—3 vase cilindrice, dar se recomandă a se repeta operația într-un singur cilindru, deoarece lichidele ce se folosesc la deparafinare se procură foarte greu.

Pentru o îndepărtare treptată a xilenului și în același timp și dizolvarea totală a parafinei, se trec lamele într-un vas cilindric cu xilol + alcool absolut, în proporție de 1:1, unde se lasă câteva minute, pentru eliminarea ultimelor resturi de parafină. În continuare, pentru îndepărtarea xilolului, secțiunile se trec în alcool absolut, în vederea înlocuirii xilolului cu alcool absolut.

2.3.6. HIDRATAREA SECȚIUNILOR

În funcție de colorantul care urmează a fi folosit la colorarea secțiunilor, hidratarea acestora se face diversificat. Astfel, dacă colorantul pe care îl vom utiliza este în soluție apoasă, atunci lamele cu secțiuni se trec din alcool absolut prin seria de alcool de concentrații descrescînde, pentru a le hidrata mai întâi și apoi a le colora.

În cazul în care vom folosi un colorant în soluție alcoolică, de exemplu, 70%, atunci lamele cu secțiuni se vor trece din alcool absolut în alcool de 95%, apoi 80%, 70%, după care se trec direct în colorant.

Deoarece majoritatea coloranților utilizați sînt în soluție apoasă, după deparafinarea secțiunilor, se trece la *hidratarea* acestora, pentru a le putea colora și apoi la *deshidratarea* lor, ca să poată fi montate în balsam de Canada.

Hidratarea se realizează trecînd lamele cu secțiuni din alcool absolut prin seria de alcool etilic în concentrații diferite, descrescînde. Pentru aceasta se lucrează succesiv cu cîte o lamă în felul următor: se scoate lama cu o pensă din alcool absolut și se introduce în alcool 95%, unde se scufundă și se scoate de cîteva ori (fig. 9). În același mod se procedează și pentru concentrațiile următoare de alcool: 80%, 70%, 55%, 35%, 15% și apoi în apă curată de robinet.

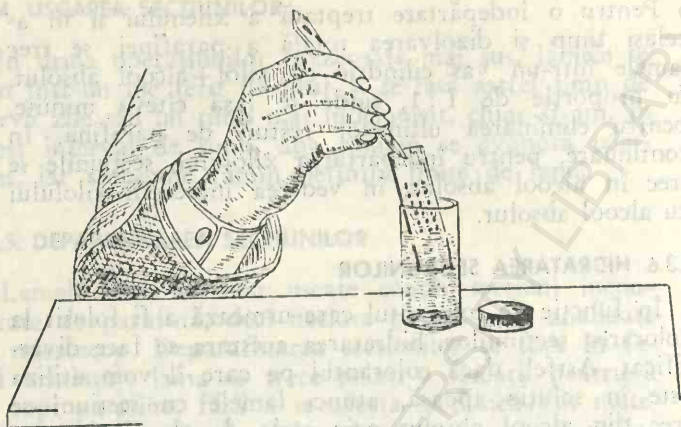


Fig. 9 — Scufundarea lamelor în paharul Borell, operație care se face în etapele de deparafinare, deshidratare, spălare, colorare și includere (original)

2.3.7. COLORAREA SECȚIUNILOR

Se scot lamele cu secțiuni din apă curată și se trec în colorantul ales corespunzător cu scopul cercetării. De exemplu, pentru colorarea cu hematoxilină Erlich se așază lama cu secțiuni înspre observator, pe hîrtie de filtru, hîrtie sugativă sau chiar pe hîrtie obișnuită. Peste secțiuni se pun 1—2 picături din colorantul respectiv, în care se mențin cîteva minute, pînă cînd secțiunile încep să capete culoarea corespunzătoare colorantului utilizat. În continuare, se spală lama cu secțiunile colorate, prin introduceri și scoateri succesive într-un vas cu apă de robinet sau la un jet slab de apă de robinet lăsat să curgă pe dosul lamei. Secțiunile sînt bine colorate cînd apa în care s-au spălat rămîne curată, adică incoloră.

În cele ce urmează prezentăm cîteva operații ce se efectuează cu secțiunile deja colorate. Lamele cu astfel de secțiuni se trec din apă în seria de alcool de concentrații diferite, în ordinea 15%, 35%, 55%, 70%, 80% și 95%, cu scopul de a se obține deshidratarea preparatelor. Pentru îndepărtarea ultimelor urme de apă, lamele se trec de două ori în alcool absolut. Fiind necesară acum și eliminarea alcoolului, se adaugă xilol pentru înlocuire, deoarece acesta este miscibil cu mediul de includere a secțiunilor. Se realizează în acest scop o serie de amestecuri prin care se trec succesiv lamele cu secțiunile colorate, lăsându-le în fiecare amestec cîteva minute. Seria de alcool absolut, în amestec cu xilen și xilenul pur, este următoarea:

— alcool absolut I ; alcool absolut II ; alcool+xilol 2 : 1 ;

— alcool+xilol 1 : 1 xilol+alcool absolut 2 : 1 ; xilen I, xilen II.

Cu ajutorul unei pense se scoate lama cu secțiuni din xilen II și se așază pe o hîrtie de filtru sau pe sugativă, orientînd-o cu secțiunile pe partea superioară. Apoi, cu o baghetă de sticlă, se pun 2—3 picături din mediul de includere, de exemplu balsam de Canada. Se așază apoi lamela, sprijinind-o cu una din margini pe lamă, încît să nu se formeze bule de aer și astfel se obține în final un preparat fix care durează timp nelimitat. Se șterge apoi lama, se notează așa cum s-a arătat mai înainte și se lasă cîteva zile să se usuce, după care se poate analiza la microscop.

2.3.8. FORMAREA BLOCURILOR DE CELOIDINĂ ȘI MONTAREA ACESTORA PE SUPORTURI

Indiferent de metoda folosită pentru solidificarea celoidinei, se scoate masa de celoidină cu obiectele incluse și se întărește puternic, fixîndu-se perfect de suport.

Suporturile din lemn cu șanț longitudinal se folosesc mai ales la fixarea fragmentelor de ramuri. Pentru a monta materialul de secționat pe aceste suporturi, se scoate materialul din celoidina solidificată (obținută după metodele 1—3), se așază în șanțul longitudinal al suportului, lăsându-se în afara acestuia 10—15 mm. Se fixează bine cu așchii de lemn și apoi se adaugă o cantitate mare de celoidină îngroșată în jurul materialului, ea întărindu-se prin scufundare în cloroform. Obținerea de secțiuni longitudinale radiare și tangențiale prin ramură se realizează punând materialul pe suport de lemn simplu și se procedează ca și în cazul precedent (fig. 6).

După cca 2 minute, când suprafața celoidinei s-a întărit, se apasă ușor materialul spre a se corecta eventual orientarea acestuia în vederea secționării.

Montarea pe suporturi a unor materiale incluse în celoidină și întărite prin scufundare în cloroform și apoi păstrate în amestec de alcool + glicerină 1 : 1, necesită o imersare în amestecul alcool etilic absolut, care se va schimba de 2 ori la intervale de 2—8 ore. Astfel, se obține îndepărtarea resturilor de apă din lichidul de conservare, se înmoaie celoidina, fără ca aceasta să se dizolve. Se trec apoi obiectele în celoidină solidificată de consistență potrivită pentru turnare și după cel puțin 24 ore, acestea se montează pe suporturi, care se scufundă în cloroform, unde continuă să se întărească.

Uneori este necesară reorientarea obiectelor în vederea secționării, care se poate face numai în momentul scoaterii acestora din amestecul de păstrare, adică din alcool + glicerină 1 : 1 ; 2 : 1 sau alcool 70%.

Resturile de celoidină obținute din diferitele etape ale procesului de impregnare, includere și montare pe

suporturi, pot fi recuperate prin evaporarea solventului într-o capsulă puțin adâncă, într-un loc ferit de praf și sursă de foc. Pelicula uscată care se obține se taie bucăți și se usucă la 53°C. Celoidina obținută astfel se folosește la prepararea soluției de 2% și 4% celoidină pentru impregnare.

2.3.9. SECȚIONAREA BLOCURILOR DE CELOIDINA

Blocurile astfel fixate vor fi secționate la cel puțin 3 ore de la lipirea pe suport sau mult mai bine a doua zi. Acest timp poate fi scurtat prin folosirea cloroformului și în acest scop blocurile proaspăt lipite de suporturi și uscate la aer vor fi scufundate în cloroform curat 20—30 minute, timp în care ele își capătă soliditatea necesară, după care pot fi secționate.

Blocurile de celoidină care cuprind materiale biologice vegetale incluse se secționează de obicei la microtomul cu sanie.

Grosimile secțiunilor care se pot realiza variază între limite largi, ca și în cazul parafinei. Cea mai mică grosime realizabilă fără dificultate este de cca 4 μ , dar se pot face și secțiuni de 50 μ . În principiu, se pot obține și din blocurile de celoidină serii continue de secțiuni ca și în cazul parafinei. Deoarece secțiunile nu rămân atașate una de alta, adică nu formează benzi sau panglici, prelucrarea lor în succesiunea corectă nu este atât de simplă ca la secțiunile în parafină.

Înainte de începerea efectuării secțiunilor, cu ajutorul unei pensule, se va umecta continuu cu alcool de 70% atât suprafața obiectului, cât și a briciului de microtom. De pe brici tot cu pensula umectată în alcool 70%, se iau secțiunile și se scufundă într-un vas cu alcool de aceeași concentrație sau în alcool de 95%.

Secțiunile pot fi colorate imediat sau pot fi păstrate timp îndelungat în alcool + glicerină 1 : 1.

Unele materiale se pot secționa relativ ușor, dar dificultățile apar după secționare. Secțiunile se pot răsuci curînd după desprinderea de pe briciul microtomului și acestea se vor rula tot mai mult în cursul colorării și deshidratării. Fiind fragile, secțiunile se rup dacă se încearcă să fie îndreptate pentru montarea pe lame. Pentru a evita rularea secțiunilor se procedează în felul următor : se ia secțiunea cu ajutorul pensulei umectată cu alcool și se pune pe o lamă de sticlă pe care se află o peliculă de alcool + glicerină și se așază cu concavitatea în jos ; se aliniaza astfel secțiuni succesive pe lamă, apoi se pune deasupra lor o lamă uscată. Lamele cu secțiunile presate astfel între ele se trec într-o cutie Petri, deasupra lor se așază greutatea de plumb, apoi vasul se umple cu apă. Într-o cutie Petri se pot pune mai multe asemenea perechi de lame. Apa face secțiunile flexibile și facilitează etalarea lor. Secțiunile sînt apoi spălate și colorate. Pentru o depozitare prelungită, lamele cu greutatea se trec într-un vas Petri cu alcool și glicerină, în care secțiunile se întăresc în stare aplatizată și pot fi păstrate timp nelimitat. Secțiunile care au fost păstrate mai mult timp, plutind sau presate în alcool + glicerină, vor fi trecute treptat în apă și apoi vor putea fi colorate.

2.3.10. SECȚIONAREA BLOCURILOR DE GELATINA

Pentru a se efectua secțiuni prin obiectele incluse în gelatină se scot blocurile din soluția de formol, se spală timp de 30—60 minute, apoi se montează pe suporturi de lemn sau mai bine pe un dop de plută, cu ajutorul unei soluții de gelatină și acid acetic (1 : 1), topită în baia mariană, în prezența alcoolului de 95%, într-o

cantitate egală cu $1/2$ din cantitatea amestecului gelatină-acid acetic (1 : 1). Secțiunile se pot face imediat după ce au fost fixate blocurile pe suport. Secționarea blocurilor de gelatină se face cu ajutorul microtomului de congelare.

Secțiunile obținute din blocurile de gelatină formalizate se trec într-o soluție de NaOH 10% în care se lasă timp de 30 minute la termostat, la 37°C, în vederea îndepărtării gelatinei. Acest procedeu este necesar pentru obținerea unor preparate microscopice de bună calitate, deoarece gelatina rămasă în secțiuni se colorează intens. Apoi secțiunile sînt spălate în apă de robinet, la jet continuu, după care pot fi colorate asemănător cu secțiunile obținute prin metoda congelării sau pot fi lipite pe lame prin intermediul albuminei glicerinate.

Deoarece blocurile obținute după metoda descrisă mai sus sînt destul de moi, chiar și după formalizare, secționarea se face cu greutate. Din acest motiv se poate utiliza următoarea variantă îmbunătățită : se vor folosi 3 soluții de gelatină de : 12,5 %, 25% și 50% în apă. Obiectele sînt trecute, după fixarea și spălarea respectivă, succesiv în aceste 3 soluții, fiind ținute în fiecare din ele între 24 și 36 ore, în termostat la temperatura de 37°C. Apoi obiectele se pun în vase adecvate într-o nouă soluție de 50% gelatină, unde sînt ținute 15—30 minute. După răcirea gelatinei, blocurile sînt suficient de tari încît nu mai este necesară trecerea lor prin formol. Blocurile se secționează la microtomul de congelare la scurt timp după includere, deoarece nu pot fi păstrate mai mult de 1—2 săptămîni (în borcane bine închise, la rece).

Lipirea secțiunilor pe lamă se face astfel : lamele foarte curate se ung cu albumină Mayer, apoi pentru îndepărtarea gelatinei din secțiuni, acestea se lipesc pe

lame și se usucă prin aplicarea deasupra lor a unei hîrtii de filtru uscată sau îmbibată cu alcool 95%. După uscarea cu hîrtie de filtru a secțiunilor fără a fi ținute la aer, se trec repede lamele prin apă încălzită la 40°C. Gelatina se va topi și după aceea secțiunile pot fi colorate. Se lucrează cu atenție, deoarece secțiunile se pot dezlipi ușor.

Dacă gelatina a fost complet eliminată, secțiunile pot fi montate după oricare dintre procedeele menționate. Dacă această eliminare a gelatinei n-a reușit, se vor monta la cald în glicerină sau într-un amestec de glicerină-gelatină, în părți egale.

Capitolul III

FIXATORII

La includerea materialului vegetal în diferite medii (vezi 2.2.1.1.) s-a arătat că prin fixare se urmărește păstrarea unor celule sau țesuturi, pe cât posibil, în stare nealterată, datorită tratării acestora cu anumite soluții denumite *fixatori*, care le omoară brusc, întrerupându-le toate procesele vitale. Dintre acești fixatori vom prezenta pe cei mai importanți, în funcție de proprietățile lor și în ordine alfabetică.

3.1. FIXATORI SIMPLI

În tehnica de fixare a materialului vegetal se utilizează fie lichide fixatoare simple, fie în amestec. Dintre lichidele fixatoare simple, unele dau rezultate foarte bune, iar altele nu sînt recomandabile, ducînd la rezultate necorespunzătoare, însă acestea pot fi folosite în amestec.

3.1.1. ACIDUL ACETIC GLACIAL (CRISTALIZABIL)

Este un lichid incolor care se folosește în majoritatea cazurilor în amestec cu alte substanțe. Singur se folosește mai rar și mai ales pentru contrastarea nucleelor în pre-

paratele proaspete. Spre deosebire de alcoolul etilic, acidul acetic glacial determină umflarea puternică a conținutului celular. Adesea se folosește în soluție apoasă de 1%. Conservă foarte prost citoplasma și distruge condriomul.

3.1.2. ACIDUL CROMIC (H_2CrO_4)

Acest acid se prezintă sub formă de cristale de culoare roșie închis, este o substanță higroscopică și toxică, fapt pentru care se păstrează în flacoane bine închise. Se folosește în soluție de 1% în apă distilată. Acțiunea fixatoare se exercită mai bine în amestecuri cu acid acetic glacial (acid crom-acetic). Se folosește rareori singur, deoarece produce contracția conținutului celular; se găsește însă în mai multe combinații, de exemplu, în lichidul lui *Flemming*. În soluții apoase de 10% acid cromic se pot fixa: alge filamentoase, foliole, rădăcini și tulpini tinere ș.a. În soluție de acid cromic, materialul nu se ține mai mult de 24 de ore, deoarece o acțiune mai îndelungată asupra acestuia produce macerarea țesuturilor.

3.1.3. ACIDUL OSMIC (OsO_4)

Este impropriu numit acid osmic, fiind de fapt tetraoxidul de osmiu, se prezintă sub formă de cristale gălbui, volatile, din care cauză se închid în tuburi mici de sticlă. Cantitatea de OsO_4 din tub nu depășește 1 g. Manipularea tuburilor cu OsO_4 prezintă unele dificultăți, deoarece, fiind foarte volatil, emite vapori extrem de iritanți pentru ochi și căile respiratorii. Din aceste motive se impun măsuri prealabile pentru prepararea soluției: mai întâi tuburile se curăță de etichetă și resturile de lipici cu apă sau acid cromsulfuric, apoi cu o

pilă de fiole se crestează destul de adânc și se introduc într-o sticlă brună cu dop rodat, la fel spălată, în care se află o soluție apoasă de acid cromic 1% (0,5 g OsO_4 la 120 ml soluție 1% de acid cromic).

Concentrația obișnuită a soluției este de 1 sau 2 %; ea poate fi făcută în apă distilată, dar mai bine în acid cromic 1%. După Cori, se poate adăuga soluției apoase o foarte mică cantitate de permanganat de potasiu, suficientă pentru producerea unei colorații roz. După Pintzner și Mayer, se adaugă la 100 ml de soluție apoasă 10 picături de soluție apoasă de sublimat 5%, care se folosește cu rezultate bune a doua zi.

Pentru fixare se folosește OsO_4 , atât în stare de vapori cît și ca soluție. Fixarea cu vapori de OsO_4 este cunoscută și sub denumirea de *afumare*. Pentru folosirea vaporilor se așază materialul într-o picătură de apă pe lamă. Cu multă atenție se întoarce lama cu fața în jos, se așază deasupra sticlei deschise în care se află soluția de OsO_4 și se ține sub acțiunea vaporilor două, trei minute, deoarece expunerea de durată reduce colorabilitatea obiectelor. Această metodă de fixare cu vapori se folosește pentru obiecte foarte mici, de exemplu: flagelate, gameți, fragmente de epidermă.

Acidul osmic omoară rapid celulele și fixează bine citoplasma și nucleul. El dă elementelor țesutului o aparență omogenă și o diferențiere optică fină întrucît nu este coagulant. Pentru fixarea citoplasmei se recomandă combinarea lui cu acidul cromic sau acetic, întrucît singur pătrunde foarte greu în țesuturi.

Acidul osmic este fixatorul electrono-microscopic, astăzi universal folosit, al cărui pH este menținut la 7—7,3 cu o soluție tampon de Veronal. Acidul osmic este cu atât mai avantajos cu cît reacționînd cu lipoizii din plasmă, poate fi considerat și ca un colorant. El colo-

rează substanțele grase în negru și este folosit ca atare pentru punerea în evidență a acestora.

Nici acidul osmic nu a satisfăcut în ultimul timp pretențiile citologilor, deoarece acesta nu determină contraste evidente. După numeroase încercări cu paladiu, aur, uraniu etc., inconvenientul a fost rezolvat în 1956 de *Strugger* care, după fixarea cu OsO_4 , tratează materialul cu acetat de uranil, obținând în acest fel contraste accentuate.

3.1.4. ACIDUL TRICLORACETIC ($\text{Cl}_3\text{C}-\text{COOH}$)

Se prezintă sub formă de cristale incolore, solubile în apă și alcool. Este un precipitat energetic al albuminelor și un ușor oxidant al țesuturilor. În combinație cu formolul se întrebuințează la fixarea condriomului. Se folosește în soluție de 1% ca fixator și 5% ca decalcifiant.

3.1.5. ALCOOLUL ETILIC (ETANOL) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Alcoolul etilic se folosește ca fixator (în concentrație de 92—95%), denaturat cu eter de petrol, benzen, fenol etc. sau sub formă de alcool absolut fără adaus.

Adesea se obțin rezultate bune și cu alcool medicinal, care este mult mai ieftin decât alcoolul etilic. Alcoolul etilic singur se utilizează ca fixator atunci când nu interesează decât cercetarea pereților celulari. În acest scop, materialul vegetal se fixează în alcool etilic cel puțin 24 ore, apoi, fără să se spele, se trece la javelizarea, colorarea și efectuarea preparatelor.

Pentru o fixare eficientă se vor utiliza la o parte material 100 părți alcool etilic 95%. Materialul menținut

un timp îndelungat în alcool etilic devine fragil ; pentru prelucrarea lui în continuare se va trece mai întâi câteva minute în apă de robinet.

În cazul când analizăm un material vegetal proaspăt, foarte fin, pentru a-i mări consistența în vederea ușurării secționării lui, îl vom introduce câteva ore în alcool etilic concentrat.

Alți alcooli, ca metanolul (alcool metilic), izopropanolul (alcool izopropilic), se utilizează de obicei în amestec cu alte substanțe.

3.1.6. BICLORURA DE MERCUR (SUBLIMATUL COROSIV - HgCl_2)

Se prezintă sub formă de cristale albe, lucioase, foarte toxice. Este relativ solubilă în apă rece, în alcool, eter și benzen, foarte ușor solubilă în apă caldă. Pentru prepararea unei soluții apoase saturate se dizolvă 10 g HgCl_2 în apă caldă, se lasă să se răcească și apoi se decantează.

În soluție apoasă este un oxidant puternic, care precipită albuminele, mai ales cele din nucleu.

3.1.7. BICROMATUL DE POTASIU

Acțiunea bicromatului ca fixator este bine cunoscută. Se știe că *bicromatul de stronțiu* și de zinc fixează bine citoplasma, dar distruge nucleul. *Bicromatul de bariu*, de *calciu* și de *cupru* fixează bine nucleele în mitoze, dar nu și citoplasma.

Cel mai folosit este *bicromatul de potasiu* ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), care se prezintă sub formă de cristale mari, portocalii-roșii, ușor solubile în apă. Se prepară o soluție de bicromat de potasiu 5 g în 100 ml apă distilată. Această

soluție se conservă în flacoane ermetic închise. $K_2Cr_2O_7$ precipită taninurile vacuolare pe care le colorează în brun.

3.1.8. CLORURA DE ZINC ($ZnCl_2$)

Este o sare albă, care se dizolvă în apă cu mare degajare de căldură. Se păstrează în flacoane ermetic închise. Se folosește în soluție de 2% în apă distilată; fragmentele de țesuturi se țin în această soluție opt zile. Clorura de zinc 2% conservă diferite obiecte vegetale tot atît de bine ca și formolul, permițînd apoi includerea lor în diferite medii.

3.1.9. FORMALDEHIDA (FORMOLUL)

Formaldehida ca fixator, joacă un rol important din cauza penetrabilității lui mari. Materialul fixat în formol este incomod de cercetat din cauza acțiunii lui iritante asupra mucoaselor nasului și ochilor.

De obicei, materialul fixat în formol, care urmează să fie cercetat, se trece mai întîi în apă ușor amoniacală.

Se recomandă folosirea formolului neutru, pentru a preîntîmpina o eventuală precipitare în timpul fixării. Neutralizarea se face folosind cîteva bucățele de marmură. Se recomandă menținerea pe fundul sticlei a unor bucăți mici de marmură.

În tehnica citologică se folosește mult formolul 10% simplu sau în combinație. În mod obișnuit, în excursii și expediții se folosește ca fixator formolul 5%, adică 1 parte formol și 20 părți apă, obținut din formolul din comerț de 40%.

În cazul în care în materialul fixat cu formol s-au produs precipitate, se recomandă tratarea acestuia timp de 10 minute cu următoarea soluție :

Potasiu (tablete) în soluție	
apoasă de 1%	1 ml.
Alcool 80°	25 ml.

După mărimea și permeabilitatea obiectelor, fixarea se realizează în cca 30 de minute pentru alge mici și ciuperci, iar pentru plante superioare pînă la 24 ore. Pentru alge se folosește soluția de aldehidă formică 2—4%, care permite timp îndelungat conservarea acestora. Materialul fixat în formol 24 ore se poate prelucra mai departe după o bună spălare cu apă curgătoare.

3.1.10. IODUL

Constituie un mediu de fixare, atît în soluție cît și în stare de vapori. Este folosit pentru fixarea organismelor mici (de exemplu, flagelate ș.a.). Pentru acestea este indicat iodul în stare de vapori, sub acțiunea căruia se țin două trei minute. Procedul de fixare constă în așezarea obiectelor pe care vrem să le fixăm, mai întîi pe lamă într-o picătură de apă. Apoi se introduc cîteva paiete de iod într-o capsulă de porțelan, se încălzește la o flacără mică și în clipa în care se degajă vaporii, de culoare violetă, se așază lama cu picătura în jos deasupra capsulei timp de 2—3 minute.

Iodul în soluție se folosește pentru fixare sub două forme și anume: *soluția Lugol* și *tinctura de iod*. În ambele soluții se fixează flagelate, alge mici, spermatozoizi de la flagelate, mușchi și ferigi. Fixarea se realizează prin introducerea, într-un pahar, a materialului dacă este în cantitate mare, peste care se lasă să cadă cîteva picături din una din soluții. Materialul viu moare rapid, cade la fundul vasului, de unde este aspirat cu

ajutorul unei pipete și pus pe lamă pentru observare. Dacă materialul este în cantitate foarte mică (de exemplu spermatozoizii), se pune direct pe lamă într-o picătură de apă, se acoperă cu lamela și apoi se introduce soluția de iod pe sub lamelă.

3.2. AMESTECURI FIXATOARE

Amestecurile fixatoare poartă în general denumirea autorilor care au publicat pentru prima dată compoziția lor.

În decursul timpului au apărut noi variante ale amestecurilor fixatoare existente sau chiar amestecuri noi. Din acest motiv, pentru a respecta realitatea, fixatorii nu au mai fost denumiți cu numele autorilor, ci cu nume care exprimă compoziția lor chimică.

Prezentăm, în continuare, cele mai des folosite amestecuri fixatoare.

3.2.1. AMESTECURI FIXATOARE PE BAZĂ DE ALCOOL

Alcoolul poate fi folosit, în diferite concentrații, ca fixator, dar se obțin rezultate mult mai bune utilizându-se diferite amestecuri pe bază de alcool.

Fixatorul Carnoy este foarte mult folosit în citologie, pentru fixarea vîrfurilor vegetative meristemate, în vederea cercetărilor cariologice ; se prepară astfel :

Alcool etilic absolut	6 părți
Cloroform	3 părți
Acid acetic glacial	1 parte

Timpul de fixare este în funcție de mărimea materialului. Atunci cînd materialul are dimensiuni mari, el rămîne în soluție 24 ore, după care se spală cu apă

de robinet tot atîta timp. Durata de fixare poate fi și foarte scurtă, de maximum una două ore în cazul materialelor fine și mici. O rețetă simplificată a *fixatorului Carnoy*, folosită cu succes, constă în următoarea combinație :

Alcool etilic absolut	3 părți
Acid acetic glacial	1 parte

Materialul se ține în fixator 24 ore, după care se spală în apă de robinet tot atîtea ore. Materialul spălat în apă se trece prin seria de alcooli (15%, 35%, 55% etc.) sau se poate trece direct din fixator în alcool de 95%, apoi în alcool absolut, în funcție de soluția colorantă folosită.

Fixatorul alcool-formol-acid acetic (AFE) este un fixator indicat pentru licheni, dar cu rezultate bune este utilizat și pentru celelalte grupe de plante. Se prepară astfel :

Alcool etilic (70%)	90 ml
Acid acetic glacial	5 ml
Formol (40%)	5 ml

Fixatorul formol-propio-alcoolic este folosit îndeosebi pentru fixarea materialelor vegetale care aparțin lichenilor și mușchilor. Acidul propionic înlocuiește acidul acetic din fixatorul precedent, păstrîndu-se aceeași proporție. S-a dovedit a fi un fixator mai bun decît cel cu acidul acetic.

Fixatorul Landowski se folosește în cercetările de citologie, în analize cariologice. Se prepară în două variante din aceleași lichide, dar în proporții diferite.

Prima variantă :

apă distilată	20 părți
alcool de 95%	10 părți

formol 40%	3 părți
acid acetic glacial	0,5 părți

și a doua variantă :

apă distilată	30 părți
alcool de 95%	15 părți
formol 40%	5 părți
acid acetic glacial	1 parte

Fixatorul metanol-acid formic este utilizat la fixarea algelor filamentoase și se prepară din amestecul :

metanol (alcool metilic)	3 ml
acid formic	1 ml

Fixator Morel-Dalous este un fixator general și se folosește sub forma unui amestec din :

formol 40%	10 părți
acid acetic glacial	10 părți
alcool etilic absolut	10 părți

Materialul se ține în fixatorul respectiv de la 30 minute până la o oră, după care se spală cu alcool etilic absolut.

În citologia vegetală adesea se recomandă spre folosire următoarea combinație : alcool absolut, glicerină și apă în părți egale. Acest fixator dă materialului de studiu o consistență favorabilă secționării. De asemenea, se folosește cu rezultate bune lactofenolul 10% la cald.

Fixatorul Pfeiffer se obține din :

metanol	30 ml
formol 40%	30 ml
acid acetic glacial	30 ml

Acest fixator este utilizat pentru fixarea plantelor inferioare (alge de apă dulce, ciuperci, licheni și mușchi), cu același rezultat pe care-l are AFE (alcool-formol-acid acetic) pentru plantele superioare. În multe cazuri amestecul lui P f e i f f e r se folosește și la fixarea unor organe de la plantele superioare. Durata de fixare depinde de mărimea și natura materialului botanic. Astfel, pentru alge filamentoase de apă dulce, după 30 minute pînă la maximum o oră, se realizează fixarea. La bazi-
diomicete fixarea durează 24 ore.

Acest fixator se poate folosi tot atît de bine și ca mediu de conservare ; practic unele materiale (criptogame) se păstrează timp nelimitat.

Fixatorul lui Schaudinn este utilizat pentru fixarea materialului vegetal din grupa flagelatelor. Se prepară din :

soluție apoasă de sublimat (7 g în	
100 ml apă)	100 ml
etanol (alcool etilic) 92%	50 ml
acid acetic glacial	5 ml

Fixatorul lui Stosch se folosește la fixarea diatomeelor ; este un amestec alcătuit din :

metanol	3 părți
alcool etilic-acid acetic 1 : 1	1 parte

3.2.2. AMESTECURI FIXATOARE PE BAZA DE CROM

Acidul cromic singur și dicromații folosiți nu sînt fixatori prea buni și de aceea ei sînt întrebuițați în diferite combinații.

Fixatorul dicromat de potasiu-formol ; se prepară astfel :

dicromat de potasiu 3%	8 ml
formol neutru	2 ml

Se folosește la fixarea materialelor vegetale pentru cercetarea complexului mitocondrial. El trebuie pregătit în momentul folosirii din cauza acțiunii reductoare a formolului.

Fixatorul crom-acetic se caracterizează prin aceea că efectul contractant al acidului cronic este compensat de acidul acetic. Pentru prepararea acestui fixator, cantitățile celor două substanțe pot varia în limite largi. Astfel, se prepară acidul crom-acetic slab din :

CrO ₃ (10% în apă)	2,5 ml
acid acetic (10%)	5 ml
apă distilată	92,5 ml

Acest amestec este indicat pentru materiale ușor penetrabile, de exemplu : alge filamentoase, ciuperci, frunzulițe și capsule secționate de la mușchi, precum și protale de pteridofite. Pentru vîrfuri de rădăcini, ovule și muguri florali, se folosește un amestec mijlociu, care se prepară din :

CrO ₃ (10 % în apă)	7 ml
acid acetic (10%)	10 ml
apă distilată	83 ml

Pentru materialele tari, de exemplu, frunze coriacee, țesuturi lignificate, se utilizează un amestec *tare*, în compoziția căruia intră :

CrO ₃ (10 % în apă)	10 ml
acid acetic (10%)	10 ml
apă distilată	80 ml

Durata de fixare depinde de natura obiectelor astfel : algele filamentoase se fixează într-o oră, iar ovulele, mugurii florali pînă la 24 ore, după care se spală și apoi se trece la efectuarea preparatelor microscopice.

De obicei, acizii crom-acetici au efect ușor macerator, uneori materialul putînd fi deteriorat, în special cînd se trece la spălare. De aceea, se cere a se manipula cu multă grijă obiectele care au fost fixate în acest amestec.

Fixarea nu trebuie să dureze decît timpul *strict necesar*, iar spălarea trebuie să se facă imediat cu apă de robinet curgătoare, pînă cînd aceasta nu mai apare colorată roșatic sau gălbui din cauza resturilor acidului cromic.

Materialele fixate în amestecul crom-acetic se colorează bine, folosind coloranți pe bază de anilină, safrafină, violet de gențiană ș.a.

Fixatorul cromo-fero-acetic (Guinard) se folosește pentru fixarea conținutului sacului polinic și se prepară astfel :

CrO ₃ (10% în apă)	0,5 ml
clorură ferică	0,5 g
acid acetic	2 ml
apă distilată	100 ml

Fixatorul cromo-formic se folosește pentru fixarea materialului destinat cercetărilor citologice. Se prepară astfel :

CrO ₃ (10% în apă)	200 ml
acid formic concentrat	cîteva picături

Fixatorul Helly se prepară în modul următor :

apă distilată	100 ml
clorură mercurică	5 g
bicromat de potasiu	25 g
formol (40%)	10 ml

Acest fixator se prepară în momentul în care este nevoie de el, deoarece este foarte instabil. În acest fixator, pentru cercetările generale, obiectele nu trebuie să rămână mai mult de 7 pînă la 8 ore ; pentru mitocondrii, fixarea trebuie să dureze de la 24 ore pînă la mai multe zile.

Fixatorul lui Karpecienko se prepară din următoarea combinație :

CrO ₃ (10% în soluție apoasă) .	1,5 ml
acid acetic (10%)	10 ml
formol (40%)	0,83 ml
apă distilată	23,67 ml

Amestecul se prepară înaintea întrebuintării ; durata de fixare este de la 12 la 24 ore.

Fixatorul Merkel se folosește pentru organisme marine și se prepară în felul următor :

CrO ₃ (10% în apă)	1 ml
clorură de platină	1 g
apă	800 ml

Materialul se ține în fixator patru pînă la șase zile și apoi se spală în alcool.

Fixatorul Navașin modificat de Bruun este un foarte bun fixator folosit în citologia vegetală, în cercetările de cariologie și embriologie. Acest amestec este utilizat frecvent pentru fixarea vîrfurilor de rădăcini, ovule, muguri florali ș.a. Pătrunderea soluției în materialele respective este lentă, de aceea nu se folosește la fixarea obiectelor mari. Soluția Navașin-Bruun constă de fapt din două soluții care se amestecă în părți egale în momentul fixării materialului. Iată cele două soluții :

Soluția A

CrO ₃ (10% în apă)	5 ml
acid acetic glacial	3,5 ml
apă distilată	42 ml

Soluția B

formol (40%)	15 ml
apă distilată	35 ml

Se recomandă păstrarea soluției A într-o sticlă de culoare închisă. Obiectele ținute în acest fixator prezintă avantajul că se întăresc, fiind astfel ușor de prelucrat în continuare. Eliminarea fixatorului din materialele vegetale se poate face folosind alcool 50% sau, dacă obiectele sînt prea dure, se spală chiar în alcool de 70%. În asemenea situație se realizează o mare economie de timp, suprimîndu-se în afară de spălarea cu apă, și o parte din treptele de spălare cu alcool. Durata fixării este de obicei 24 de ore, după care se spală în apă de robinet tot atîtea ore sau spălarea se poate realiza în trei reprize a cîte 15 minute în alcool, așa cum s-a menționat mai sus. Materialele care au fost fixate în soluțiile Navașin se colorează excelent cu safranină, violet de gențiană și albastru de anilină.

Fixatorul Orth se recomandă pentru lucrări de citologie fină. Se prepară înainte de folosire și nu se lasă materialul în el decît 24 ore.

dicromat de potasiu	2 g
sulfat de sodiu	1 g
formol 10%	10 ml
apă	100 ml

Fixatorul micro-formol Regaud se obține din amestecul a 8 ml soluție saturată de acid picric cu 2 ml for-

mol neutru. Se utilizează în același scop ca și fixatorul Helly.

Fixatorul Tellyesniczky constituie un excelent fixator pentru citoplasmă și nucleu. Materialul care se fixează nu trebuie să depășească 5 mm grosime. Soluția se prepară astfel :

dicromat de potasiu	3 g
acid acetic glacial	5 ml
apă	100 ml

Se lasă materialul în fixator 1—2 zile, după care se spală 24 ore și se trece lent prin seria de alcool, începînd cu alcool de 15%. Materialul astfel fixat suportă orice colorare ulterioară.

3.2.3. AMESTECURI FIXATOARE PE BAZA DE ACID OSMIC

Acidul osmic singur reprezintă un bun fixator al materialelor biologice, în vederea efectuării studiilor cario-logice ; el poate fi utilizat și în diferite amestecuri.

Fixatorul Benda

acid osmic 2%	12 ml
CrO ₃ (1% în apă)	25 ml
acid acetic glacial	6 picături

Fixatorul Champy este folosit pentru cercetări cito-logice în următoarea combinație :

dicromat de potasiu 3%	7 părți
CrO ₃ (1% în apă)	7 părți
acid osmic 2%	4 părți

Materialul fixat cu lichide care conțin acid osmic se păstrează în vase de sticlă colorată.

Fixatorul cromo-aceto-osmio-alcoolic (Saragat) se folosește pentru fixarea sacului embrionar. Se prepară în modul următor :

soluție apoasă de acid cromic 10%	8 ml
soluție apoasă de acid osmic 1%	8 ml
acid acetic glacial	4 ml
alcool etilic absolut	27 ml

Materialul se lasă mai multe ore în acest fixator, apoi se trece timp de 18—24 ore într-o soluție de acid cromic 5%, după care se spală succesiv timp de 24 ore în următoarele concentrații de alcool : 30 %, 50 %, 70 %.

Fixatorul Flemming (cromo-aceto-osmic) este foarte bun pentru studiul nucleului și drept urmare este utilizat numai pentru fixarea obiectelor foarte mici, de exemp'lu, vîrfuri de rădăcini secționare, antere etc. Acest fixator se pretează bine la colorația ulterioară cu safranină. Soluția Flemming se prepară astfel :

CrO ₃ (1% în apă)	15 părți
acid osmic 2%	4 părți
acid acetic glacial	1 parte

Acest amestec se prepară în cantități mici ; pentru un volum de obiect se folosesc patru, cinci volume de soluție. Materialul se fixează timp de 24 ore, după care se spală bine cu apă de robinet și apoi se trece prin seria de alcool de diferite concentrații.

Fixatorul cromo-formo-osmic (G. P i a n e s e) se folosește pentru fixarea structurilor fine ale celulelor ; se prepară astfel :

CrO ₃ (25% în apă)	5 ml
acid osmic 2%	5 ml
cloroplatină 1%	15 ml
acid formic	1 picătură

Fixatorul Hermann se folosește ca și lichidul Flemming și se prepară astfel :

clorură de platină	15 ml
acid acetic glacial	1 ml
acid osmic 2%	2 ml

Fixatorul Lindsay Johnson se folosește pentru fixarea citoplasmei și a organitelor din celule în următoarea combinație :

dicromat de potasiu 2,5%	70 părți
acid osmic 2%	10 părți
clorură de platină 1%	15 părți
acid acetic sau acid formic	5 părți

3.2.4. AMESTECURI DIVERSE

Pe lângă fixatorii amintiți, se mai pot utiliza diferite alte amestecuri fixatoare cu rezultate foarte bune. Dintre acestea se prezintă :

Fixatorul Bouin, care se prepară din :

acid picric, în soluție apoasă saturată .	75 ml
formol 40%	25 ml
acid acetic glacial	5 ml

Este folosit în mod deosebit în histologia animală, dar și unele materiale vegetale pot fi fixate cu rezultate bune (de exemplu vîrfuri de rădăcini, ovule și antere). Materialul se ține în fixator, cca 24 ore (chiar și după cîteva zile, nu se deteriorează), după care se spală în alcool de 70%, care se schimbă de cîteva ori. Obiectele fixate în Bouin se pretează la împarafinare.

Fixatorul Bouin-Allen este utilizat pentru unele obiecte în care soluțiile de fixare pătrund greu, de exemplu, unii muguri florali. Amestecul fixator se obține

astfel : se dizolvă 1,5 g CrO_3 în 100 ml soluție Bouin la 37°C , în momentul folosirii lui, deoarece eficiența acestuia nu durează decât 30—60 minute. Materialul se ține în acest fixator încălzit maximum patru ore, după care se spală în alcool de 70% și apoi se include în parafină. Colorații excelente se obțin cu hematoxilină ferică.

Pentru fixarea algalor verzi se folosesc :

Soluția cuprică, care se prepară din :

acetat neutru de cupru (soluție apoasă 4%)	1 parte
formol	1 parte
apă	8 părți

Tot pentru algele verzi se recomandă următoarea soluție, pentru fixare și conservare de lungă durată :

lactofenol	50 g
clorură de cupru (CuCl_2)	95 g
acetat de cupru	2 g

Pentru studiul citologic al algalor filamentoase, verzi sau roșii, se recomandă ca fixator o soluție cromo-acetică, care se prepară din :

CrO_3 (10% în apă)	1 ml
acid acetic glacial	4 ml
apă	400 ml

După fixare, materialul se poate colora cu hematoxilină ferică și monta în balsam de Canada sau gelatină glicerinată.

Pentru studiul pirenoizilor, al pereților de natură pectică și diferiți cromatofori, Baumgärtel a folosit următorul amestec, care poate avea aplicații generale :

hemateină	0,01 g
acid picric	0,5 g
biclorură de mercur	1 g
alaun de potasiu	1 g
alcool etilic 95%	20 ml
apă distilată	80 ml

Materialul se ține pentru fixare în această soluție 5 ore. După aceea se spală, se deshidratează și se montează în balsam de Canada.

Fixatorul formic pentru alge se obține dintr-o soluție de aldehidă formică 2—4%, care permite conservarea timp îndelungat a algelor verzi. Materialul se poate monta după o prelucrare adecvată în balsam de Canada, pentru obținerea de preparate fixe.

Fixatorul lactofenol este un amestec folosit de obicei în micologie, alcătuit din :

acid lactic	40 g
glicerină	80 g
apă distilată	40 ml
fenol	80 g

Lactofenolul se poate păstra mult timp, dar cantitățile componentelor pot suferi modificări.

Fixatorul lactofenolul cupric este un amestec alcătuit din două soluții și anume :

Soluția I este cea a lactofenolului din amestecul precedent ;

Soluția II se prepară astfel :

CaCl ₂ (soluție apoasă 0,5%) . . .	100 ml
acetat de cupru (soluție apoasă 0,5%)	100 ml

Cînd ne este necesar fixatorul, se amestecă la 10 părți lactofenol 1 parte din soluția II.

Fixatori pentru licheni. Aceștia sînt utilizați în mod special pentru licheni, dar tot atît de bine pot fi folosiți și pentru alte grupe de plante; vom prezenta mai multe amestecuri fixatoare :

I)	{	acid acetic glacial	2 ml
		formol (40%)	5 ml
		apă	93 ml

II)	{	formol (40%)	5 ml
		acid acetic glacial	3 ml
		glicerină	20 ml
		apă	72 ml

III)	{	acid acetic glacial	5 ml
		formol (40%)	10 ml
		alcool etilic 95%	50 ml
		apă	1000 ml

IV)	{	clorură de zinc (dizolvată în apă fierbinte și filtrată)	50 ml
		formol (40%)	25 ml
		glicerină	25 ml

Capitolul IV

COLORAȚIA ȘI COLORANȚII

Prin *colorație* se înțelege mecanismul fizico-chimic de combinare dintre constituenții celulari și o substanță colorantă. Coloranții sînt combinații organice naturale sau sintetice care au proprietatea de a ceda culoarea lor diferitelor substraturi pe care sînt aplicați, punîndu-le clar în evidență. Colorația este o tehnică necesară și obligatorie în cercetările cito-histo-embriologice.

Tehnicile de colorare sînt *simple* atunci cînd folosim un singur colorant (de exemplu: colorarea cromozomilor cu acid carmin-acetic) sau *multiple*, cînd utilizăm succesiv sau simultan doi sau mai mulți coloranți.

În general, pentru anumite structuri (cromozomi, plastide, mitocondrii ș.a.), colorările simple dau un contrast mai bun decît cele multiple, deoarece adesea, cel de al doilea colorant slăbește pe primul.

Colorările multiple se pretează pentru structuri alcătuite din mai multe țesuturi diferite (rădăcină, tulpină ș.a.). Cei doi coloranți se pot afla în aceeași soluție (colorare *simultană*) sau în soluții diferite (colorare *succesivă*).

Colorarea, la rîndul ei, este *progresivă* și *regresivă*.

4.1. COLORAREA PROGRESIVĂ

Colorarea progresivă se practică atunci cînd dorim să colorăm numai anumite elemente ale unei structuri *. În momentul cînd intensitatea culorii a ajuns la limita celei dorite, întrerupem colorarea prin spălare cu apă. Dimpotrivă, dacă colorarea secțiunii se face mai încet, prelungim timpul de colorare pînă la punctul optim. Se utilizează frecvent în laboratoare, fiind ușor de realizat (de exemplu colorația cu alizarin viridină vezi pag. 169).

4.2. COLORAREA REGRESIVĂ

Colorarea regresivă presupune, mai întîi, colorarea integrală și uniformă a structurii, după care se trece la *diferențierea* acesteia în funcție de scopul urmărit. Diferențierea constă în trecerea structurii colorate printr-o soluție decolorantă, în vederea măririi contrastului sau aducerii acesteia la o colorare superioară. Anumite elemente ale structurii vor fi decolorate mai repede decît altele și de aceea în timpul diferențierii este obligatorie verificarea la microscop a structurii.

Se va ține seama că la microscop structurile acoperite cu apă arată mai întunecate decît după montarea lor în preparate permanente.

Prin colorarea regresivă se obțin preparate colorate diferențiat, cu detalii fine, nuanțate din punct de vedere al intensității colorării (de exemplu: colorarea cu hematoxilina Heidenhain, cu safranină ș.a.).

*) Folosim termenul de structură în sens general, pentru a desemna atît secțiunile cît și obiectele nesectionate, care urmează a fi analizate la microscop.

Cei mai mulți coloranți se fixează pe țesut fără vreo pregătire specială a acestuia. Asemenea coloranți se numesc direcți (de exemplu : eozina). Alții nu aderă, nu sînt adsorbiți de către țesut decît după o prealabilă tratare (mordansare) cu soluții speciale (mordanți). Aceștia sînt cunoscuți sub numele de *coloranți indirecti* (de exemplu : hematoxilina).

4.3. COLORANȚII FOLOSIȚI ÎN TEHNICILE DE MICROSCOPIE

Se cunoaște un număr mare de coloranți care se utilizează în microtehnica botanică. În ceea ce privește nomenclatura acestora, există mari neconcordanțe și inexactități. Acestea se referă la: denumiri comerciale diferite pentru coloranți cu aceeași compoziție chimică, denumiri populare care nu exprimă compoziția chimică, simboluri exprimate prin litere și cifre, numai la anumiți coloranți etc. Este important de reținut faptul că atunci cînd întîlnim asemenea simboluri, ele exprimă particularități pe care nu trebuie să le neglijăm. În esență, după D. Gerlach, 1977, simbolurile sînt traduse astfel: *A* — bun pentru acetat de celuloză; *B* — colorant de nuanță albastră; mai multe litere *B* ca *BB*, *12 B* (sau o succesiune de alte litere) indică intensificarea nuanței albastre; *C* — rezistă la clor; *D* — pentru imprimare; *F* — ton clar; *G* — nuanță verde; *H* — rezistent la căldură; *L* — ușor solubil sau rezistent la lumină; *M* — amestec; *S* — se solubilizează bine; *T* — nuanță profundă; *W* — solubil în apă; *Y* — gălbui. Mai recent, în „Color-Indexul american“, fiecare colorant chimic poartă un anumit

număr, indiferent de numele comercial. În acest fel, coloranți cu aceeași compoziție chimică, dar cu nume diferite, au primit același număr.

4.4. COLORANȚI, ACIZI BAZICI ȘI NEUTRI, METACROMAZIA

Se vorbește de coloranți-acizi sau *anodici* atunci când ionul cromofor este un anion, adică cu sarcină electrică negativă. În cazul când ionul cromofor este un cation, adică este electropozitiv, vorbim de coloranți *bazici* sau *catodici*. Coloranții care în soluții apoase sînt foarte slab disociați, la orice pH, se numesc *neutri*.

Orientativ, soluțiile coloranților bazici se utilizează la colorarea nucleelor și a pereților celulari lignificați, iar cele ale coloranților acizi pentru citoplasmă și pereții celulari de natură celulozică. Dar colorarea organelor celulare depinde într-o măsură însemnată de tipul de fixator, pH, puritatea colorantului, mordantului, timpul și temperatura de colorare, concentrația ș.a.

Uneori, efectul colorării este altul decît cel așteptat. Așa de pildă, după D. Gerlach a 1977, constituenți ai unor drojdii se colorează în roșu cu soluția de albastru de metilen. Fenomenul este cunoscut sub numele de *metacromazie*.

4.5. PURITATEA COLORANTULUI

Efectul coloristic al unei substanțe folosite în tehnica cito-histo-embriologică se datorește în mare măsură purității acesteia. Adesea, coloranții se prezintă în diferite grade de impurificare. Determinarea purității colorantului se face astfel: se pune o picătură din soluția de

cororant pe o bucată de hîrtie de filtru. Se lasă 1—3 minute și se observă cu atenție; dacă marginea spotului este altfel colorată decît centrul, este un indiciu că soluția încercată este impură și reprezintă un amestec de doi coloranți.

Recomandăm ca în cercetările științifice de detaliu să se verifice mai întîi rețeta unui colorant, pregătind o cantitate mică din soluția respectivă și numai în cazul că rezultatele sînt bune, să se treacă la o cantitate mai mare. Dacă prima soluție este nesatisfăcătoare, se vor modifica concentrația și durata de colorare a acesteia pînă cînd rezultatele vor fi cele așteptate.

4.6. COLORANȚII FRECVENT UTILIZAȚI IN LABORATOR ȘI TEHNICA DE COLORARE

Prezentăm în continuare, în ordine alfabetică, cei mai utilizați coloranți și modul de execuție al colorării.

4.6.1. ACETOCARMIN

Substanțe necesare: carmin; acid acetic (CH_3COOH), FeCl_3 , acid propionic ($\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—COOH}$).

Modul de preparare. Într-un balon Erlenmeyer de 500 ml, prevăzut cu refrigerent de reflux sau cu o țevă de 1,5 m lungime, se introduc 1—2 g carmin mărunțit și 100 ml acid acetic 45%. Totul se fierbe la o flacără mică, 30 minute. După răcire, amestecul se filtrează și se introduce într-un vas cu dop rodat pentru conservare. Dacă se folosește în locul acidului acetic, acid propionic, se va dizolva mai mult carmin. Acidul carmin-acetic (carmin-propionic), astfel pregătit, colorează cromozomii în roșu. Pentru a imprima cromozomilor o colorare roșie-negricioasă se adaugă

soluției de mai sus, picătură cu picătură, o soluție apoasă de 10% FeCl_3 pînă cînd acetocarminul se colorează în roșu negricios, fără să precipite. Se adaugă soluției cu FeCl_3 tot atîta soluție carminoacetică (carmin propionică), fără fier.

Tehnica de colorare :

1. Într-o eprubetă de cîțiva centimetri se pune puțin acid carmin acetic pregătît ca mai sus ;

2. În soluția respectivă se introduc vîrfurile vegetative meristematice ;

3. Se încălzește, agitînd lichidul, 5 minute ;

4. Se toarnă conținutul eprubetei într-un vas Petri ; vîrfurile vegetative meristematice sînt scoase din lichid și puse pe lamă într-o picătură de carmin acetic ;

5. Se așază lamela și peste ea o fișie de hîrtie de filtru, pe care se apasă cu degetul arătător (fără să deplaseze lamela) ;

6. Dacă colorația este slabă, se trece pe sub lamelă o picătură de carmin acetic și se încălzește ușor lama ;

7. Preparatul se analizează *imediat* sau după luterarea lui cu parafină.

Efectul colorării. Cromozomii mitotici sau meiotici se co'rează în roșu spre negru, iar citoplasma rămîne incoloră sau se colorează în roșu slab.

Recomandări. Cele mai bune colorări se obțin cu soluție proaspătă. La adăugarea FeCl_3 în soluția carminoacetică (carmin propionică), se va avea în vedere că o cantitate de FeCl_3 mai mare decît trebuie determină precipitarea și respectiv abandonarea soluției carminacetice. Soluția fără FeCl_3 se păstrează mai bine decît cea cu fier. Se recomandă ca adăugarea de FeCl_3 să se facă la scurt timp înainte de întrebuițare. Colorația acetocarminică cu etalare sub lamelă se recomandă pentru cercetările cariologice, atît la plantele inferioare cît și la cele superioare. Rezultate foarte bune se obțin după

o fixare cu alcool-acid acetic. Nu se recomandă fixări cu amestecuri cu acid cronic. Examinarea la microscop trebuie făcută imediat după confecționarea preparatului.

Adesea, rezultatele sînt mai bune dacă materialul biologic se colorează direct, fără o fixare prealabilă în alcool-acetic. Stabilirea timpului de fixare, colorare, adăugarea sau renunțarea la FeCl_3 ș.a. se stabilesc prin încercări pe diferite materiale biologice.

4.6.2. ACID PERIODIC – SCHIFF

Substanțe necesare : acid periodic, reactiv Schiff, apă cu SO_2 .

Modul de preparare. Se prepară 3 soluții diferite, A, B și C astfel :

Soluția A : se dizolvă 0,5 g acid periodic în 100 ml apă distilată ;

Soluția B : reactivul Schiff (vezi pag. 178).

Soluția C : apă + SO_2 (vezi pag. 178).

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile se spală cu apă distilată ;
2. Se colorează cu soluția A timp de 5 minute, la temperatura camerei ;
3. Se spală cu apă de robinet (schimbată de cîteva ori), apoi cu apă distilată ;
4. Se colorează cu soluția B, 30—60 minute ;
5. Se spală cu apă + SO_2 (vezi punctul g, pag. 180) ;
6. Se spală cu apă de robinet (schimbată de cîteva ori) ;
7. Se deshidratează în seria de alcool etilic, xilen și se montează în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Recomandări. Reacția acid periodic — Schiff se folosește pentru identificarea selectivă a polizaharidelor, pe care le colorează în diferite nuanțe de roșu. Soluția

A poate fi conservată timp îndelungat ; în locul acesteia se poate folosi o soluție apoasă de acid cronic 5%, la temperatura camerei timp de 1 oră.

4.6.3. ACID PICRIC ȘI ALBASTRU DE ANILINĂ

Substanțe necesare : albastru de anilină, acid picric.

Modul de preparare. Se dizolvă cca 5 g anilină în 100 ml apă, după care se amestecă cu o soluție saturată de acid picric în apă.

Tehnica de colorare :

1. Se așază algele într-un vas și se acoperă cu soluția de colorant. Se lasă în contact 3—5 minute ;

2. Se spală cu apă de robinet, schimbată de câteva ori ;

3. Se efectuează apoi preparate proaspete în apă și se examinează la microscop.

Efectul colorării. Nucleeele celulelor talului se colorează în albastru închis.

Recomandări. Timpul de colorare (vezi punctul 1) se stabilește în funcție de specie. Ca și în cazul apei de iod și eozină, colorarea celulelor talului cu acid picric și albastru de anilină se face treptat, așa încât putem întâlni în același tal celule complet colorate, abia colorate și necolorate în același tal.

4.6.4. ACRIDIN-ORANJ

Substanțe necesare : acridin-oranj.

Modul de preparare. Se dizolvă 0,1 g acridin-oranj în 500 ml apă de robinet, înainte de folosire.

Tehnica de colorare :

1. Se acoperă frotiul bacterian proaspăt cu o picătură de colorant și se lasă în contact 5—10 minute ;

2. Se absoarbe excesul de colorant și se aplică lamela. *Efectul colorării.* În lumină albastră, unele bacterii gram negative dau o fluorescență verde și adesea prezintă peretele celular colorat în roșu. Alte bacterii, ca și majoritatea bacteriilor grampozitive, se colorează uniform în roșu.

Recomandări. Înainte de colorare, se va evita uscarea frotiului. Nu se recomandă spălarea lamei înainte de aplicarea lamelei. Colorația se folosește atât pentru bacterii cât și pentru algele albastre-verzi.

4.6.5. ALAUN DE CROM ȘI ALIZARIN VIRIDINA

Substanțe necesare. Alaun de crom ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) sin. sulfat dublu de Cr și K. Se prezintă sub formă de cristale sau pulbere de culoare violet închis. Alizarin viridină ($\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_7\text{SNaH}_2\text{O}$). Se prezintă sub formă de ace sau pulbere de culoare galbenă-portocalie.

Modul de preparare. Se dizolvă, prin agitare, 2 grame de alizarin viridină într-o soluție apoasă clocotindă de 50% alaun de crom (mordant). Se lasă să se răcească, apoi se filtrează și se utilizează imediat sau se va păstra în sticle colorate și bine închise.

Tehnica de colorare :

1. Se spală materialul în apă distilată ;
2. Se trece în colorant și se ține 2—24 ore ;
3. Materialul colorat se spală cu apă distilată pînă cînd ultima apă apare incoloră ;
4. Materialul se include în glicerină, gelatină glicerinată, rășini sintetice.

Efectul colorării. Colorează conținutul celular (nuclee, nucleoli, citoplasmă, pirenoizi, cromatofori) în verde de diferite nuanțe.

Recomandări. Rezultate bune se obțin după o fixare a materialului cu amestecuri cu acid cronic sau amestecul Pfeiffer.

4.6.6. ALAUN DE CROM ȘI POTASIU – HEMATOXILINĂ

Substanțe necesare : Hematoxină, alaun de crom și potasiu, acid sulfuric, bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$).

Modul de preparare. Se dizolvă, în 50 ml. apă distilată caldă, 0,5 g hematoxină. Soluția apoasă rezultată are culoarea roșie-gălbui. Acesteia i se adaugă 50 ml soluție apoasă 3% de alaun de crom și potasiu. Se adaugă apoi 2 ml H_2SO_4 , 0,5 N și 2 ml soluție apoasă 5% de bicromat de potasiu. Soluția astfel pregătită, se filtrează și se folosește imediat. Utilizarea ulterioară a soluției se va face întotdeauna după o preabilă filtrare.

Soluția de alaun de crom și potasiu — hematoxină se poate conserva un timp relativ scurt (nu mai mult de o lună).

Tehnica de colorare :

1. Materialele biologice (vîrfuri vegetative, antere tinere, ovule tinere ș.a.) se introduc în HClN, unde se țin 10 minute la temperatura camerei ;

2. Se trece apoi în HClN la 60°C, pentru 8—12 minute ;

3. Se spală cu apă distilată, după care se colorează 20—40 minute la 60°C ; materialele biologice se colorează în albastru închis, omogen ;

4. Se diferențiază 30 minute — două ore în acid acetic 45%, urmărind la microscop eliminarea colorantului din citoplasmă și menținerea lui în nucleee și cromozomi ;

5. Materialul biologic astfel colorat se pune pe lamă într-o picătură de acid acetic 45% și se etalează sub lamă, prin strivire cu ajutorul unui bețișor de chibrit ;

6. Preparatele se lutează sau se includ în rășini sintetice.

Efectul colorării. Deși colorația nu este specifică pentru ADN, nucleele și cromozomii se colorează în albastru închis.

Colorația se recomandă atât pentru obținerea preparatelor prin strivire cât și pentru cele incluse în parafină, după o prealabilă deparafinare. Se recomandă ca fixator alcoolul etilic absolut—acidul acetic 3 : 1.

4.6.7. ALAUN DE FIER ȘI ACETOCARMIN

Substanțe necesare: alaun de fier și potasiu ($\text{KFe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$); acid carmin acetic.

Modul de preparare. Se pregătesc două soluții diferite, A și B, astfel :

Soluția A : se prepară mai întâi o soluție saturată de bază de alaun de fier și potasiu în apă. Din soluția de bază se prepară 4 soluții de diluții diferite în apă distilată : 1 : 1 ; 1 : 10 ; 1 : 100 ; 1 : 1000.

Soluția B : acid carmin-acetic.

Tehnica de colorare :

1. Materialul se mordansează cu soluția A, cu diluția cea mai potrivită (după o testare prealabilă), nu mai mult de 30 secunde ;

2. Se spală cu apă de robinet 5 minute, cu schimbarea apei de câteva ori ;

3. Se colorează cu soluția de aceto-carmin : materialul cu colorantul se fierbe pe lamă ; timpul de colorare se determină experimental (prin control la microscop) ;

4. Se examinează în stare proaspătă sau ca preparate permanente (vezi pag. 60).

Efectul colorării. Cromozomii se colorează în negru până la brun.

Recomandări. Colorația de mai sus se aplică cu bune rezultate la alge, în general după o testare prealabilă a soluțiilor și a intensității colorației (vezi punctul 1 și 3). Se pot folosi și alți alauni: alaunul de crom sau de aluminiu în modul descris pentru alaunul de fier și potasiu. Se recomandă o fixare prealabilă a materialului în alcool-acid acetic. Rezultate bune se obțin și cu verde-metil-pironină (vezi pag. 223).

4.6.8. ALBASTRU ASTRA ȘI SAFRANINA

Substanțe necesare: albastru Astra, safranină, acid tartric;

Modul de preparare. Se prepară 3 soluții diferite astfel:

Soluția A: în 100 ml soluție apoasă de acid tartric 2% se dizolvă 0,5 g albastru Astra;

Soluția B: se dizolvă în 100 ml apă distilată 1 g de safranină;

Soluția C: se adaugă la 100 ml alcool etilic 70%, 0,5 ml HCl concentrat.

Tehnica de colorare:

1. Secțiunile deparafinate se trec în apă distilată pentru 5—10 minute;

2. Se trec apoi în albastru Astra, timp de 5 minute;

3. Se spală cu apă distilată;

4. Se trec în safranină timp de 5 minute;

5. Se introduc în alcool etilic 70% timp de 5 minute, pentru eliminarea excesului de colorant;

6. Se diferențiază cu soluția C; întreruperea diferențierii se face atunci când pereții celulozici se colorează în albastru curat, iar cei lignificați în roșu (constatarea făcută la microscop);

7. Secțiunile se trec în alcool etilic de 80%, 90%, 95%, 100%, apoi xilol-alcool 1:1; 2:1; xilol curat.

8. Se montează în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați se colorează în roșu, iar cei celulozici în albastru.

4.6.9. ALBASTRU DE METILEN (D. LÖFFLER)

Substanțe necesare: albastru de metilen, alcool etilic 70%, KOH.

Modul de preparare. Se dizolvă 2 g de albastru de metilen în 100 ml alcool de 70%. O cantitate de 30 ml din această soluție de bază nefiltrată se diluează cu 100 ml apă distilată, la care se mai adaugă 1 ml dintr-o soluție de KOH 1% în apă. Înainte de utilizare se filtrează. Atît soluția de bază cît și cea de lucru se pot conserva un timp îndelungat.

4.6.10. ALBASTRU DE METILEN ȘI ROȘU DE RUTENIU

Substanțe necesare: albastru de metilen, soluție 1% în apă de KOH, roșu de ruteniu, alcool etilic 70%.

Modul de preparare. Vezi modul de preparare la albastru de metilen și la roșu de ruteniu.

Tehnica de colorare:

1. Secțiunile se colorează cu albastru de metilen, 5—10 minute;

2. Se spală cu apă de robinet, schimbată de cîteva ori;

3. Secțiunile se introduc în roșu de ruteniu, 5—10 minute;

4. Se spală cu apă de robinet pînă cînd nu se mai degajă colorant;

5. Se includ în gelatină glicerinată sau după deshidratare în seria de alcool etilic în rășini sintetice.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați se colorează în albastru; cei nelignificați în violet; suberul se colorează în verde, iar parenchimul și vasele floemateice în roșu-roz.

4.6.11. ALBASTRU DE REZORCINĂ ȘI ACID ACETIC

Substanțe necesare: albastru de rezorcină (lacmoid), acid acetic sau acid propionic 50%.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g albastru de rezorcină în 100 ml acid acetic (sau propionic) 50% cu încălzire ușoară.

Efectul colorării. Cromozomii se colorează în brun; citoplasma se colorează în brun mai închis (uneori).

Tehnica de colorare și recomandările sînt aceleași ca la colorația aceto-carminică.

4.6.12. ALBASTRU DE REZORCINĂ ȘI GALBEN MARTIUS

Substanțe necesare: albastru de rezorcină, galben Martius, amoniac 25%.

Modul de preparare. În 100 ml apă distilată se dizolvă 50 mg albastru de rezorcină și 50 mg galben Martius. Se adaugă apoi cîteva picături de soluție diluată cu apă 1:100 de amoniac 25%, pînă la apariția unei nuanțe măslinii.

Tehnica de colorare:

1. Stile proaspete, întregi sau secționare, se strivesc între două lame de sticlă;
2. Se colorează 5 minute cu soluția de mai sus;
3. Se așază lamela și se analizează la microscop.

Efectul colorării. Se colorează în albastru deschis dopurile de caloză din tuburile polinice. Adesea colo-

rația este destul de palidă și greu de sesizat contrastul la microscop; din acest motiv, se va folosi lumină puternică.

Tuburile polinice bogate în granule de amidon se colorează vizibil după clarificarea și colorarea stilelor cu iod-fenol.

Pe secțiuni microtomice, atât tuburile polinice cât și hifele miceliene din țesuturile plantelor atacate, se pot urmări numai pe distanțe scurte.

Recomandări. Pentru colorarea secțiunilor microtomice se recomandă colorări cu safranină — Lichtgrün, soluția Pianese, iar pentru nucleele generative se aplică colorația Feulgen.

4.6.13. ALBASTRU DE TOLUIDINA

Substanțe necesare: albastru de toluidină, soluție tampon cu $\text{pH}=7$.

Modul de preparare. Se dizolvă 0,03 g albastru de toluidină în 100 ml soluție tampon cu $\text{pH}=7$ sau apă de robinet dacă are acest pH .

Tehnica de colorare:

1. Se așază secțiunile (cu sau fără conținut celular) pe lamă într-o picătură de colorant, 1—5 minute.

2. Se acoperă cu lamela și se analizează la microscop.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați și suberificați, precum și nucleul se colorează în albastru-verzui; celuloza și adesea lamela mijlocie în roșu-purpuriu sau roșu-violet.

Recomandări. Colorația cu albastru de toluidină se recomandă pentru evidențierea naturii chimice a pereților celulari. Se fac secțiuni de mână din materiale fixate în prealabil în alcool-formol-acid acetic; secți-

unile din material proaspăt trebuie fixate în prealabil, 1 minut în acest fixator. Accelerarea colorării (v. punctul 1) se realizează printr-o ușoară încălzire.

4.6.14. ALBASTRU DE TOLUIDINĂ (D. SAKAI)

Substanțe necesare : albastru de toluidină.

Modul de preparare. Se prepară o soluție apoasă de 0,05% albastru de toluidină în apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Lamele cu secțiuni se încălzesc ușor pentru a se lipi de sticlă, fără să se ajungă la topirea parafinei ;

2. Se introduc în colorant lamele cu secțiunile nedeparafinate și se lasă 2—30 minute ;

3. Se scufundă de câteva ori într-un pahar Borel cu apă distilată ;

4. Se lasă să se usuce ;

5. Se deparafinează în xilen ;

6. Se include în balsam de Canada sau în rășină sintetică.

Efectul colorării. Pereții celulozici, citoplasma și organele care conțin ARN, se colorează în roșu ; pereții lignificați și suberificați, organele care conțin ADN, taninurile, se colorează în albastru până la verde-albăstrui, iar lamela mijlocie în roșu.

Recomandări. Fixarea materialului se va face în alcool-acid-acetic, sau alcool-formol-acid acetic.

Se va evita topirea parafinei din secțiuni în momentul întinderii acestora pe lamă.

4.6.15. ALIZARINVIRIDINĂ - ALBASTRU DE METILEN

Substanțe necesare : alizarinviridină și alaun de crom, albastru de metilen.

Modul de preparare. Se prepară o soluție de alaun de crom și alizarinviridină (vezi pag. 162) și o soluție

apoasă, saturată la rece prin dizolvarea a 9 g albastru de anilină în 100 ml apă. Se amestecă 20 ml din prima soluție cu 1 ml din cea de a doua.

Tehnica de colorare :

1. Materialul fixat se introduce în amestecul colorant pentru 1—2 ore ;

2. Se spală cu apă de robinet (schimbată de câteva ori) ;

3. Se include în gelatină glicerinată.

Efectul colorării. Citoplasma se colorează în verde, iar unele incluziuni sau organite în negru. Tecile gelatinoase ale algelor se colorează în albastru.

Recomandări. Materialul biologic se va fixa în acid crom-acetic sau în amestecul Pfeiffer.

4.6.16. APĂ DE IOD ȘI EOZINĂ

Substanțe necesare : eozină, iod.

Modul de preparare : Se dizolvă 1 g de eozină în 100 ml apă distilată. Se adaugă apoi, agitînd continuu, cristale mici de iod, pîna cînd pe fundul flaconului mai rămîn cîteva nedizolvate. Soluția se poate conserva mai multă vreme.

Tehnica de colorare :

Algele se depun pe o lamă într-o picătură de colorant, după care se așază lamela.

Efectul colorării. După 15—30 minute, cloroplastele devin brunii, iar nucleele roșiatice. Intensitatea colorației crește treptat, cu viteză diferită în lungul filamentului.

Recomandări. Colorația se recomandă în cercetările taxonomice, la identificarea speciilor de alge dintr-un anumit grup. Reușita colorației este legată de dizolvarea unei cantități suficiente de iod în soluția de eozină ; practic, soluția trebuie să emane un miros puternic de iod.

4.6.17. AZOCARMIN B

Substanțe necesare: azocarmin B, acid acetic glacial.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g azocarmin B în 100 ml apă distilată cu încălzire ușoară. Se adaugă apoi 1 ml acid acetic glacial. După completa răcire, se filtrează. Soluția poate fi conservată un timp îndelungat.

Tehnica de colorare:

1. Materialul fixat în acid crom-acetic se spală cu apă de robinet de câteva ori schimbată;
2. Se mordansează în HCl 10%, 1 oră;
3. Se spală cu apă de robinet, curgătoare;
4. Se colorează în soluție de azocarmin B;
5. Se spală cu apă de robinet; apoi după deshidratare se include în rășină sintetică.

Efectul colorării. Celulele talului, în afară de pereții celulari, se colorează în diferite nuanțe de roșu.

Recomandări. În cazul când materialul a fost fixat în formol, înainte de a fi prelucrat pentru colorare, se va spăla bine cu apă de robinet. Și apoi se mordansează 1 oră cu acid crom-acetic 10% în apă.

Dacă nu urmărim colorarea *naturală* a plastidelor, atât cloroficeele cât și feoficeele și rodoficeele se pot colora cu Kernechrot sau alizarinviridină. În situația respectivă, includerea se va face în gelatină glicerinată pentru evitarea contracției materialului.

4.6.18. AZOTATUL MERCUROS (REACTIVUL MILLON)

Substanțe necesare: mercur, acid azotic concentrat.

Modul de preparare. Peste 1 g mercur se adaugă 9 ml acid azotic concentrat și 10 ml apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Țesuturile endospermale și alte țesuturi, se tratează cu reactiv 3—5 minute ;

2. Se spală și se analizează la microscop.

Efectul colorării. Substanțele proteice se colorează în roșu sau roșu-roz, iar citoplasma în roșu-cărămiziu.

Recomandări. Rezultate bune se obțin folosind reactivul imediat după preparare.

4.6.19. BISMARCK BRUN

Substanțe necesare : brun Bismarck, alcool etilic 70% și 95%.

Modul de preparare. Se face o soluție, dizolvând 1 g brun Bismarck în 100 ml alcool etilic 70%. Înainte de folosire, soluția se va filtra.

Tehnica de colorare :

1. Se scoate materialul din fixator și se introduce în colorant 30—45 minute ;

2. Colorația se controlează la microscop ;

3. Se spală cu alcool 95% ;

4. Se include în rășini sintetice sau în balsam de Canada.

Efectul colorării. Celulele talului se colorează în diverse nuanțe de brun.

Recomandări. Rezultate bune se obțin după o fixare a materialului cu formol. Dacă colorarea este insuficientă (vezi punctul 2), operația ulterioară de spălare se soldează cu decolorarea accentuată a materialului care nu poate fi remediată prin supracolorare. Se impune deci o atenție sporită controlului la microscop a intensității colorației. Se recomandă pentru cercetarea feoficeelor și diatomeelor.

4.6.20. CARMIN ACETIC ȘI CLORURĂ DE LITIU

Substanțe necesare: carmin acetic, clorură de litiu (Lill), acetat de fier ($\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Modul de preparare. Se prepară două soluții A și B astfel:

Soluția A : se dizolvă 4 g de clorură de litiu în 100 ml apă distilată.

Soluția B: se prepară soluția de carmin acetic (vezi pag. 158), căreia i se adaugă puțin acetat de fier.

Tehnica de colorare :

1. Se spală după fixare 3—4 ore în apă de robinet.

2. Se tratează cu soluție A timp de 15 minute ;

3. Se introduce în apă de robinet (care nu se schimbă) ;

4. Se așază materialul pe lamă într-o picătură de apă de robinet, se acoperă cu lamela și se etalează ușor ;

5. Se introduce sub lamelă puțin acid carminacetic, prin mai multe puncte ale acesteia ;

6. Se încălzește ușor la flacăra unei spirtiere (se va evita fierberea), pînă cînd cromozomii se colorează corespunzător ;

7. Se etalează din nou și se lutează ;

8. În cazul că nu există diferență cromatică între nucleu și citoplasmă, se trece pe sub lamelă o soluție alcătuită din 5 părți acid acetic glacial la o parte de acid carmin acetic. Preparatul se încălzește 15 secunde la o flacăra slabă și apoi se analizează la microscop.

Efectul colorării. Cromozomii se colorează în nuanțe de negru, pînă la brun.

Recomandări. Cantitatea de acetat de fier se stabilește experimental (vezi soluția B.). Se recomandă fixarea materialului într-un amestec de alcool-acid

acetic. În acest amestec rămîne pînă se decolorează complet și dispare stratul gelatinos de la suprafața talurilor. În general, la piesele mici, timpul de fixare s-a stabilit la 1—12 ore.

D. Gerlach (1977) este de părere că supracolorarea citoplasmei poate fi prevenită prin fixarea timp de 1—2 ore în alcool-acetic și conservarea la 4°C la frigider în alcool etilic 70%. Și mai eficientă este colorarea materialului după o fixare scurtă, fără conservare (vezi punctele 1—8).

4.6.21. CARMINUL BORAXAT (D. GRENACHER)

Substanțe necesare: carmin, borax, metanol 90%, HCl concentrat, izopropanol absolut, alcool etilic 95%.

Modul de preparare. Se dizolvă 4 g borax în 100 ml apă distilată fierbinte, apoi se adaugă 3 g carmin mojarat. După răcire, se adaugă 100 ml metanol 90%. Se lasă 2—3 zile, după care se filtrează. Soluția rezultată poate fi utilizată imediat sau conservată un timp îndelungat.

Tehnica de colorare:

1. Materialele biologice deparafinate sau totale se introduc în alcool etilic de 50% sau 90%;

2. Se colorează 1—2 zile cu soluție de carmin boraxat;

3. Materialul colorat în roșu uniform se diferențiază imediat în HCl alcoolic (alcool etilic 92%+0,5—1% HCl concentrat), timp de 1—2 zile, pînă cînd nucleele se colorează în roșu închis, iar citoplasma în roșu deschis;

4. Se lasă 2—3 ore în izopropanol 1% (cu schimbarea acestuia de cîteva ori);

5. Se include în rășini sintetice, după tratarea corespunzătoare cu xilen.

Efectul colorării. Nucleele celulare se colorează în roșu intens, iar citoplasma în roșu deschis.

Recomandări. Carminul se folosește în botanică sub combinația acid carmin-acetic, pentru evidențierea cromozomilor prin tehnica etalării sub lamelă a materialelor biologice meristematice. Nu se vor folosi amestecuri fixatoare pe bază de acid cronic. Cele mai bune rezultate se obțin după fixarea materialelor cu amestecuri de acid picric sau cu formol. Controlul diferențierii materialului se va face la microscop (vezi punctul 3). Colorația cu carmin boraxat se recomandă, cu bune rezultate și pentru studiul algelor.

4.6.22. CLORAZOLAZURINĂ

Substanțe necesare : clorazolazurină, $MgSO_4$, alcool etilic 70% și 90%.

Modul de preparare. Se dizolvă cca 1 g clorazolazurină în 50 ml apă, apoi se adaugă 50 ml soluție 6% în apă de $MgSO_4$. Soluția se agită continuu la 80°C, timp de 1 minut. Nu se filtrează.

Tehnica de colorare :

1. Se trec secțiunile din apă distilată în colorant timp de 24 ore ;

2. Se spală cu apă de robinet, cu schimbarea apei de câteva ori ;

3. Se deshidratează succesiv, câteva secunde, în alcool 70% și 92% ;

4. Se include în rășină sintetică (Euparal).

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați se colorează în roșu violet ; pereții de natură celulozică în albastru ; suberul și cutina în galben portocaliu.

Recomandări. Se recomandă atât pentru colorarea secțiunilor microtomice cât și pentru cele de mînă efec-

tuat prin organele cormofitelor, cu condiția ca acestea din urmă să fie foarte subțiri. Se recomandă agitarea energetică a colorantului înainte de întrebuințare.

4.6.23. CLORAZOL ȘI PONTACILCARMIN

Substanțe necesare : chlorazol black (directtiewar), pontacilcarmin, cloralhidrat, alcool etilic 95%, alcool izopropilic 100%.

Modul de preparare. Se dizolvă 0,5 g chlorazol negru și 0,5 g pontacil carmin în 100 ml apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile se javelizează sau se tratează cu cloralhidrat ;

2. Se spală cu apă de robinet apoi cu apă distilată ;

3. Se colorează timp de 25 minute ;

4. Se spală cu apă distilată pentru eliminarea excesului de colorant ;

5. Se spală cu alcool 95% până când nu se mai degajă colorant ;

6. Secțiunile se montează într-o rășină, după deshidratarea lor în alcool izopropilic absolut.

Efectul colorării. Peretii celulari lignificați se colorează în roșu, cei nelignificați în negru.

Recomandări. În cazul că se spală mai mult decât trebuie (vezi punctul 5), alcoolul extrage colorantul roșu ; dacă se spală prea puțin, secțiunea rămâne colorată uniform.

4.6.24. CLORIODURA DE ZINC

Substanțe necesare : iodură de potasiu, iod, clorură de zinc.

Modul de preparare. Se dizolvă 6,5 g iodură de potasiu în 10 ml apă distilată, apoi se adaugă 1,3 g iod.

Soluției obținute i se adaugă 20 g ZnCl_2 . Rezultă un precipitat cristalin și o soluție care după decantare va servi la identificarea pereților de natură celulozică din secțiunile efectuate cu briciul sau lama.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile de mînă se așază pe lamă într-o picătură de colorant și se acoperă cu lamela ; se lasă în colorant 5—30 minute ;

2. Se examinează la microscop.

Efectul colorării. Pereții de natură celulozică se colorează în albastru ; lemnul, suberul și cutina în galben.

Recomandări. Rezultate concludente se obțin cînd materialul a fost conservat în alcool-formol-acid acetic sau alcool. Examinarea secțiunilor de mînă colorate se va face în soluția reactivului ; spălarea cu apă antrenează colorantul din secțiuni (vezi punctul 2).

4.6.25. FAST-GREEN (VERDE RAPID)

Substanțe necesare : fast-green, soluție de NaOH, acid tricloracetic.

Modul de preparare. Se dizolvă în 50 ml apă distilată, 0,05 g fastgreen, după care se aduce soluția la un $\text{pH}=8-8,1$, cu ajutorul unei soluții de NaOH diluate.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile se introduc în apă distilată ;

2. Se îndepărtează ADN cu ajutorul acidului tricloracetic 5% în apă, aflat într-o baie clocotindă ; secțiunile se țin 15 minute în acidul tricloracetic ;

3. Se spală în alcool 70% (3 părți alcool 70%, 1 parte apă distilată), timp de 10 minute și apoi în apă distilată ;

4. Se colorează 30 minute la temperatura camerei ;

5. Se spală cu apă distilată și imediat se trece în seria de alcool ;

6. Se include în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Efectul colorării. Nucleele și cromozomii se colorează în verde.

Recomandări. Colorația cu fast-green se folosește la punerea în evidență a proteinelor din cromozomi (histonelor). Se va utiliza ca fixator formolul neutru (vezi pag. 138), iar materialul se va împarafina.

4.6.26. COLORAȚIA FEULGEN '1

Substanțe necesare : pararozanilină, HCl 1 normal, piro-sulfid de potasiu sin. metabisulfid de K ($K_2S_2O_5$). cărbune activ.

Modul de preparare. Se pregătesc 3 soluții : reactivul Schiff (A) HClN/1 (B) și metabisulfidul de K (C).

Soluția A : reactivul Schiff se prepară dizolvând 0,5 g pararozanilină în 15 ml HCl 1 normal. Rezultă o soluție brună cu nuanță măslinie. Se tratează apoi cu 0,5 g $K_2S_2O_5$ dizolvat în 85 ml apă distilată. Soluția se lasă în repaus 24 ore, într-un vas din sticlă brună departe de surse de căldură și din când în când vasul se agită energic. Soluția devine gălbuie. În acest stadiu se tratează cu 0,5 g cărbune activ, după care se agită puternic. După filtrare rezultă o soluție încoloră sau ușor gălbuie.

Soluția B : HCl 1 normal se prepară introducând 100 ml HCl concentrat într-un balon cotat de 1 l, peste care se adaugă apă distilată pînă la semn.

Soluția C : $H_2O + SO_2$. Se dizolvă 10 g $K_2S_2O_5$ în 100 ml apă ; la această soluție se adaugă 200 ml apă de robinet și 10 ml HCl 1 normal. Soluția se prepară

înainte de întrebuințare și este eficientă numai dacă miroase puternic a bioxid de sulf.

Principiul reacției Feulgen. Materialul biologic fixat într-un fixator acid (alcool-acid acetic) se hidrolizează cu HCl 1 normal încălzit. Se formează în ADN grupe aldehidice libere care, intrate în reacție cu reactivul Schiff, vor produce o colorație roșie în toate organitele unde există o concentrație minimă de ADN.

Tehnica de colorare :

1. Materialul biologic se aduce din apă distilată în HCl 1 normal rece pentru foarte scurt timp (cîteva secunde) ;

2. Se hidrolizează în HCl 1 normal la 60°C (timpul exact de hidroliză se stabilește prin tatonare) ;

3. Se spală cu HCl 1 normal rece pentru întreruperea hidrolizei ;

4. Se colorează cu reactivul Schiff incolor sau slab gălbui, 3—4 ore ; pentru secțiuni microtomice 30—60 minute (materialele capătă culoarea roșie-albăstruie) ;

5. Se lasă în apă + SO₂, 15 minute secțiunile microtomice și 30 minute vîrfurile vegetative meristematice, anterele sau ovulele ;

6. Se spală în apă de robinet (cu schimbarea acesteia din cînd în cînd) 30 minute — 1 oră (culoarea roșie se intensifică) ;

7. Materialele se etalează sub lamelă și se lutează sau se includ în rășini sintetice (Entellan), după o prealabilă deshidratare.

Efectul colorării. Se colorează în roșu-albăstrui atît nucleele cît și cromozomii, precum și alte organite (mitocondrii ș.a.), în care se află ADN. Aceeași culoare o capătă pereții celulari lignificați și cutinizați ; celulele secretorii și sinergidele din ovule capătă o nuanță gălbui.

Recomandări. Reacția Feulgen se recomandă în citologie la punerea în evidență a ADN din structurile celulare (nuclee, cromozomi, plastide, mitocondrii ș.a.), atât la talofite cît și la cormofite. Pentru reușita tehnicii și evitarea erorilor la interpretare facem următoarele precizări:

a) Se va acorda atenție deosebită respectării temperaturii HCl și timpului de hidroliză; prelungirea timpului de hidroliză peste cel minimal, determină o reacție Feulgen slabă sau negativă;

b) Cum materialele prelucrate după reacția Feulgen se fixează cu amestecuri acide, hidroliza ADN începe chiar de la fixare; menținerea în aceste amestecuri a materialului peste timpul strict necesar, determină o reacție Feulgen slabă sau negativă;

c) Materialele fixate și neprelucrate imediat se vor păstra în alcool etilic de 70% (alcoolul se va schimba la început din 10 în 10 minute, pentru a elimina acidul din țesuturi);

d) Reactivul Schiff nu va fi utilizat dacă are nuanța roșie vizibilă;

e) Soluțiile proaspete sînt cele mai indicate;

f) Reactivul Schiff se poate păstra în sticle cu dop rodat, la frigider; înainte de utilizare, se aduce la temperatura camerei;

g) Pentru eliminarea completă a soluției Schiff (vezi punctul 5), materialele groiere se vor trece succésiv prin 3 pahare de 100 ml soluție alcătuită din apă + SO_2 ;

h) Pentru intensificarea colorației Feulgen, după spălare cu apă de robinet, se supracolorează 3—5 minute cu carminacetic sau orceină acetică (vezi pag. 207);

i) Orientativ, prezentăm mai jos timpii de hidroliză, în urma fixării cu diferite lichide (după D. Gerlach, 1977).

alcool etilic 100%		Bouin-Allen	22 minute
	5 minute	Acid cromacetic	
alcool-formol-acid			14 minute
acetic	7 minute	Flemming fără acid	
alcool acetic	6 minute	acetic	25 minute
alcool-acetic-cloroform			
	8 minute	Navașin	16 minute
Bouin	12 minute	Regaud	14 minute

4.6.27. COLORAȚIA FEULGEN 2

Substanțe necesare și modul de preparare (vezi pag. 178).

Tehnica de colorare :

1. Se spală 3—4 ore cu apă de robinet curgătoare pentru îndepărtarea fixatorului ;
 2. Se decolorează materialul într-o soluție apoasă 20% de apă oxigenată 3—4 ore ;
 3. Se spală 1 oră cu apă de robinet curgătoare ;
 4. Materialul se încălzește în apă distilată la 60°C ;
 5. Se hidrolizează cu HCl 1 normal la 60°C, 8—10 minute ;
 6. Întreruperea hidrolizei prin imersare în apă distilată ;
 7. Tratarea cu apă + SO₂, 1 oră, după care se etalează (prin strivire) sub lamelă ;
 8. Se scot lamelele și se acoperă lamele cu reactiv Schiff ; se lasă în contact 6 ore ;
 9. Spălarea colorantului (acid fuchs'in sulfuros), trecînd lamele prin 3 băi de apă + SO₂ ;
 10. Se spală cu apă de robinet, cu schimbarea de cîteva ori a apei ;
 11. Includerea în rășină sintetică sau naturală după deshidratarea în seria de alcool etilic.
- Efectul colorării.* Nucleele, cromozomii și alte organite cu ADN se colorează în roșu-albăstrui.

Recomandări. Se recomandă fixarea materialului algal (12—24 ore) în fixatorul Karpecienko. Dacă materialul nu se etalează ușor rezultă că timpul de hidroliză a fost prea scurt. Pentru reușita colorației se cere ca soluția de apă+SO₂ să fie proaspăt pregătită. Se recomandă la studiul algelor plectenchimatice.

4.6.28. FEULGEN - ACID PERIODIC - SCHIFF

Substanțe necesare tionină (C₁₂H₁₀N₃ClS) sau Azur A, acid periodic, reactiv Schiff, apă+SO₂.

Modul de preparare : a) se prepară, în locul reactivului Schiff din reacția Feulgen, o soluție cu tionină sau cu azur A ; b) Se pregătesc soluțiile caracteristice reacției acid periodic-Schiff după modul de preparare de la pag. 225.

Tehnica de colorare :

1. Vezi reacția Feulgen (1—7, pag. 179) ;
2. Vezi reacția acid periodic-Schiff (1—7, pag. 160).

Efectul colorării. Combinația se utilizează la identificarea ADN și a polizaharidelor în aceleași structuri. Organitele care conțin ADN se colorează în albastru, iar polizaharidele (exceptând amidonul), în roșu.

Recomandări. Amidonul ca și glicogenul nu pot fi evidențiate deoarece, prin hidroliză în mediu acid, trec în soluții.

4.6.29. FEULGEN - ACID PERIODIC - SCHIFF - GALBEN NAFTOL

Substanțe necesare : cele indicate în reacția Feulgen — acid periodic — Schiff, galben naftol S (Naphtolgelb S), acid acetic, butanol terțiar pur.

Modul de preparare. 1 g galben naftol S se dizolvă în 100 ml acid acetic 10% în apă distilată. Înainte de utilizare, soluția de mai sus se diluează cu acid acetic 10%, în proporție de 2 ml : 98 ml.

Tehnica de colorare :

1. Lamele deparafinate sînt prelucrate după tehnica Feulgen (vezi 1—7 pag. 179), cu următoarea specificație:

a) Din apa distilată lamele se trec în HCl 1 normal la 60°C timp de 12 minute ;

b) Se spală repede în soluția de azur A ;

2. Se spală bine în apă + SO₂ (vezi punctul g, pag. 180) ;

3. Se spală apoi cu apă de robinet, din cînd în cînd schimbată, 15—30 minute ;

4. Se lasă 5 minute în soluția apoasă de 0,5 acid periodic ;

5. Se spală cu apă de robinet și apoi cu apă distilată ;

6. Se colorează cu reactivul Schiff, 5 minute ;

7. Se spală cu apă + SO₂ și apoi cu apă de robinet ;

8. Se colorează cu galben naftol, 2 minute ;

9. Se spală cu apă distilată ;

10. Lamele se tamponează cu hîrtie de filtru în jurul secțiunilor și pe fața inferioară ;

11. Se scufundă într-un vas cu butanol terțiar, schimbat de două ori ;

12. Se scufundă de mai multe ori în borele de xilen și se montează în rășini sintetice.

Efectul colorării. Toate structurile care conțin ADN se colorează în albastru, polizaharidele în roșu și proteinele în galben. Organitele care conțin ADN și proteine se colorează în verde deschis-verzui. Nucleolii și citoplasma se colorează în galben.

Recomandări. Postcolorația cu galben naftol S, după reacția acid periodic-Schiff, se folosește atunci cînd dorim să identificăm, în afară de ADN și proteinele res-

pective, care se colorează specific în galben. Nu poate fi evidențiat ARN, deoarece este îndepărtat în urma hidrolizei cu HCl 1 normal.

4.6.30. FLUOROGLUCINA ACIDCLORHIDRICĂ

Substanțe necesare: fluoroglucină, acid clorhidric (sau acid percloric) alcool etilic 92%.

Modul de preparare. Se dizolvă 1—5 g fluoroglucină în 100 ml alcool etilic 92%.

Tehnica de colorare:

1. Secțiunile de mînă se așază într-o capsulă de porțelan cu soluție de fluoroglucină, 15 secunde pînă la 5 minute;

2. Secțiunile (2—3), se așază pe lamă într-o picătură de colorant, se așază lamela, apoi aspiră pe sub aceasta o picătură de HCl;

3. Preparatele se analizează imediat sau după luterarea lor.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați, uneori și cei ai endodermei, se colorează în roșu vișiniu.

Recomandări. Colorarea secțiunilor de mînă se poate face mai expeditiv, direct pe lamă, aspirînd pe sub lamelă fluoroglucina și apoi HCl.

4.6.31. FUCHSINĂ DIAMANT ȘI NaOH (D. FUCHS)

Substanțe necesare: fuchsină diamant, NaOH, alcool etilic 70%, alcool izopropilic 100%, HCl concentrat.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g fuchsină diamant în 100 ml apă clocotită. După răcire, se adaugă 10 g NaOH. Nu se filtrează.

Tehnica de colorare :

1. Se elimină clorofila din țesuturi cu alcool 70% timp de câteva zile ;
2. Se înmoaie materialul în apă de robinet ;
3. Se colorează 12 ore la 60°C ;
4. Se spală 12 ore cu apă de robinet, schimbată de câteva ori ;
5. Țesuturile se deshidratează cu alcool 50%, 70%, 92%, timp de 12 ore ;
6. Se deshidratează 1—2 ore cu alcool izopropilic absolut ;
7. Obiectele se tratează 1—15 minute cu un amestec de 3 părți alcool izopropilic absolut și 1 parte HCl concentrat ; culoarea roșie a pereților lignificați virează spre negru ;
8. Se spală cu alcool izopropilic absolut 1 oră ;
9. Se include în rășină sintetică.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați se colorează în roșu negricios, uneori și pereții celulelor stomatice. Pereții celulelor mezofilului se colorează în roșu palid.

Recomandări. Colorația se folosește, cu rezultate bune, la evidențierea țesuturilor din organele vegetative erbacee.

Eliminarea clorofilei (vezi punctul 1) este accelerată punând vasul cu obiectele în alcool la 60°C. Se va acorda atenție specială punctului 5. Timpul de tratare a obiectelor cu alcool izopropilic și HCl se stabilește exact, în funcție de mărimea obiectelor.

4.6.32. FUCHSINA FENICATĂ (D. ZIEHL – NEELSEN)

Substanțe necesare : fuchsină-diamant (fuchsină bazi-că), fenol cristalizat, alcool etilic 70%.

Modul de preparare. Se dizolvă 5 g diamant-fuchsină în 100 ml alcool de 70%. Din această soluție de ba-

ză se prepară o soluție de lucru, în felul următor : 10 ml soluție de bază, nefiltrată, se diluează cu 90 ml apă distilată, la care se adaugă 5 g fenol cristalizat. Atît soluția de bază cît și cea de lucru se pot conserva un timp îndelungat. Înainte de folosire se vor filtra.

Tehnica de colorare :

1. Se pune o picătură pe frotiul fixat prin încălzire și se lasă în contact 5 minute ;

2. Se scurge colorantul și se spală cu apă de robinet, curgătoare, pînă cînd frotiul apare incolor ;

3. Se usucă complet lamele, în poziția verticală ;

4. Pe frotiul uscat se aplică o picătură de ulei de imersie și se analizează la microscop imediat.

Efectul colorării. Colorează în roșu intens bacili și spirili.

4.6.33. GALOCIANINA ȘI ALAUNUL DE CROM

Substanțe necesare : galocianină (albastru crom strălucitor P), alaun de crom ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Modul de preparare. Se dizolvă 5 g alaun de crom în 100 ml apă distilată. Se adaugă soluției 0,15 g galocianină, după care se fierb împreună 10 minute. Apa evaporată, prin fierbere se înlocuiește cu apă distilată. Înainte de folosire se filtrează.

Tehnica de colorare :

1. Se introduc secțiunile în colorant pentru 24 ore ;

2. Se spală cu apă distilată ;

3. Secțiunile se trec prin seria de alcool și se includ în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Efectul colorării. Organitele celulare bogate în ADN sau ARN se colorează în albastru deschis spre cenușiu

pînă la negru intens, în funcție de cantitatea de acizi nucleici. Cu toate acestea, cromozomii nu sînt suficient de contrastați, ca în cazul colorației cu violet de gențiană.

Recomandări. Tehnica prezentată conduce la rezultate bune dacă materialul de cercetat se fixează într-un amestec cu acid cronic și se include în parafină.

4.6.34. COLORAȚIA GIEMSA

Substanțe necesare: soluție Giemsa, soluție tampon cu $\text{pH}=7$, HCl $\text{N}/1$.

Modul de preparare. Se prepară două soluții diferite, A și B.

Soluția A: se amestecă 1 parte soluție Giemsa cu 9 părți soluție tampon cu $\text{pH}=7$.

Soluția B: se introduc 100 ml HCl concentrat într-un balon cotat de un l și se completează cu 900 ml apă distilată. În acest fel se obține o soluție de HCl $\text{N}/1$.

Tehnica de colorare:

1. Se fixează 1—2 ore materialul biologic în alcool absolut — acid acetic glacial 3 : 1, după care se trece în apă distilată ;

2. Se hidrolizează în HCl $\text{N}/1$, la 60°C , în termostat, timp de 5—6 minute ;

3. Se spală de mai multe ori cu apă de robinet și apoi în soluție tampon ;

4. Se colorează cu soluție Giemsa (soluția A) : 2 ore pentru ciuperci și 4 ore pentru bacterii și cianoficee ;

5. Se spală cu apă de robinet ;

6. Filamentele de alge albastre sau hifele de ciuperci se separă pe lama de sticlă într-o picătură de soluție tampon și se lasă să se usuce ;

7. Înainte de includere (în rășină sintetică) se lasă câteva minute într-o picătură de xilen.

Efectul colorării. Organitele celulare care conțin acizi nucleici se colorează în roșu-violet-albastru, ceilalți constituenți celulari se colorează în roz sau rămân incolori.

Recomandări. Colorația Giemsa se folosește atunci când reacția Feulgen nu dă rezultate satisfăcătoare. Se recomandă pentru cercetarea bacteriilor, cianoficeelor și ciupercilor. Se va acorda o atenție deosebită hidrolizei cu HCl, prin respectarea temperaturii de 60°C. În cazul că apa de robinet are pH=7, va fi folosită ca soluție tampon, atît la diluarea soluției Giemsa, cît și pentru spălare.

4.6.35. COLORAȚIA GOMORI

Substanțe necesare : chromotrop 2 R, fast green, acid fosfotungstic (acid fosfowolframic), alcool etilic 90%, acid izopropilic 100%.

Modul de preparare. Se face o soluție din dizolvarea a 0,6 g chromotrop 2 R, 0,7 g acid fosfotungstic în 100 ml apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Lamele deparafinate se spală în apă distilată ;
2. Se introduc în colorant timp de 1 oră sau chiar mai mult ;
3. Lamele se diferențiază în acid izopropilic 100% ;
4. Se montează în rășini sintetice după tratarea cu xilen-alcool, 1 : 1 și xilen pur.

Efectul colorării. Peretii celulari celulozici se colorează în verde, cei lignificați în roșu ; citoplasma se colorează în roșu deschis, iar nucleeele în roșu închis. Cutina rămîne galbenă.

Recomandări. Rezultate bune se obțin după o fixare cu un amestec cu acid cronic. Colorația tricromă, după Gomori, se recomandă în cercetările cito-histo-embriologice de finețe. Adesea se recomandă diferențierea lamelor colorate (vezi punctul 3) cu alcool izopropilic de 90% sau 70%, la care se adaugă câteva picături de acid acetic glacial. În acest ultim caz, înainte de include-re într-o rășină sintetică, lamele vor fi trecute prin se-ria de alcool de concentrație superioară celei în care s-a făcut diferențierea. După aceea, în combinația xilol-alcool, xilol și montarea în rășini sintetice.

4.6.36. COLORAȚIA GRAM

Substanțe necesare : violet de gențiana fenicat, fuchsină fenicată, KI, I, apă distilată.

Modul de preparare : se pregătesc 3 soluții diferite, A, B și C astfel :

Soluția A : violet de gențiana fenicat (vezi mai sus).

Soluția B : fuchsină fenicată (vezi mai sus).

Soluția C : în 300 ml apă distilată se dizolvă mai întâi 2 g KI și apoi 1 g iod.

Tehnica de colorare :

1. Frotiul fixat prin încălzire se acoperă cu o peli-culă din soluția de violet de gențiana și se lasă în contact 3 minute ;

2. Se scurge colorantul ;

3. Se spală frotiurile cu apă de robinet curgătoare ;

4. Se mordansează cu soluția C timp de 3 minute ;

5. Frotiurile se introduc în alcool etilic 92% timp de 20—30 secunde ;

6. Se spală cu apă de robinet curgătoare ;

7. Pentru recolorare, se acoperă frotiurile cu soluție diluată de fuchsină fenicată și se lasă în contact 30 secunde ;

8. Se scurge colorantul ;

9. Se spală cu apă de robinet curgătoare ;

10. Se usucă apoi la aer ;

11. Se montează în balsam de Canada sau rășină sintetică.

Efectul colorării. Bacteriile gram pozitive se colorează în violet, în timp ce bacteriile gram negative, în roșu.

Recomandări. Rezultate corecte se obțin folosind culturi de bacterii proaspete. Culturile mai vechi de 24 ore nu se colorează concludent. Folosind colorația Gram putem deosebi foarte bine bacteriile gram pozitive de cele gram negative.

4.6.37. HEMATOXILINA ($C_{16}H_{14}O_6 \cdot 3H_2O$)

Este colorantul cel mai des utilizat în cercetările cito-histo-embriologice. Se prezintă sub formă de cristale mici, inițial incolore sau albe-gălbui ; sub acțiunea luminii și aerului devin galben-roșietice sau roșii. Hematoxilina se dizolvă bine în apă caldă sau alcool cald. Prin deshidrogenare (oxidare), hematoxilina trece în *hemateină* ($C_{16}H_{12}O_6$), colorant galben-roșietic sau roșu, formă sub care hematoxilina își exercită proprietatea de colorant.

Colorarea preparatelor biologice fixate în amestecuri lipsite de acid cronic este posibilă numai după o prealabilă mordansare (băițuire). Mordanții fac posibilă fixarea colorantului de către țesuturi, în urma unui proces chimic. Ei se folosesc separat sau direct în amestec cu hematoxilina.

Maturarea hematoxilinei. Prin maturare se înțelege de fapt dehidrogenarea acesteia. Se înțelege că fenome-

nul este deosebit de important pentru folosirea hematoxilinei în colorarea structurilor celulare. Există mai multe variante de maturare a hematoxilinei :

1. Prin expunerea hematoxilinei Heidenhain proaspăt preparată, acțiunii aerului și luminii : se lasă sticla deschisă câteva zile ;

2. Prin adăugarea de iodat de sodiu (NaIO_3), în soluția de hematoxină Heidenhain sau Delafield : 0,2 g NaIO_3 la 1 g hematoxină. Se pot utiliza și alți oxidanți ca : KIO_3 (0,2 g la 1 g hematoxină) bicromat de K ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,28 g, la 1 g de hematoxină), permanganat de potasiu (KMnO_4 , 0,18 g la 1 g hematoxină) etc. Maturarea prin ultima variantă prezintă două avantaje majore :

1. Dehidrogenarea (maturarea) hematoxilinei se face exact pînă la hemateină, fără să formeze și alți compuși ;

2. Maturarea hematoxilinei se face aproape instantaneu dînd posibilitatea folosirii imediate a acesteia.

4.6.38. HEMATOXILINĂ CU CLORALHIDRAT

Substanțe necesare: hematoxină, alaun de fier și amoniu, acid acetic 45%, cloralhidrat.

Modul de preparare. Se dizolvă 4 g hematoxină și 1 g alaun de fier și amoniu în 100 ml acid acetic 45%. Soluția se maturează într-o sticlă deschisă, la lumină, ferită de praf, 24 ore pînă la o săptămînă.

Din soluția maturată, de bază, se scot 5 ml și se tratează cu 2 g cloralhidrat. Aceasta reprezintă soluția de lucru, care nu are o viață lungă ca cea a soluției de bază.

Tehnica de colorare :

1. Din fixator, algele sînt puse pe o lamă și tratate cu soluția colorantă ; se acoperă cu lamela și se strînge ușor ;

2. Colorația cromozomilor (în cazul că este slabă) se intensifică, încălzind ușor preparatul la o flacără slabă (pînă cînd culoarea se schimbă ușor) ;

3. Se analizează la microscop.

Efectul colorării. Cromozomii se colorează în negru.

Recomandări. Soluția de bază se poate păstra un timp îndelungat în sticle bine închise. Tehnica descrisă dă rezultate bune, după fixarea materialului în amestecul alcool etilic-acid acetic și se pretează pentru toate grupele de alge, inclusiv plante superioare. Adesea cromozomii se colorează bine, fără să fie nevoie de încălzire. De aceea se recomandă verificarea colorației la microscop imediat după colorare (vezi punctul 1).

4.6.39. HEMATOXILINA, CRIZOIDINA ȘI SUDAN III

Substanțe necesare : hematoxină Delafield, crizoidină, Sudan III, alcool etilic denaturat 70%, xilen, alcool izopropilic.

Modul de preparare : Soluția A : Se prepară o soluție de bază de hematoxină Delafield (vezi pag. 193), care se diluează cu apă distilată 1 : 10.

Soluția B : se dizolvă 1 g crizoidină în 100 ml alcool denaturat 70%.

Soluția C : se prepară o soluție saturată de Sudan III în xilen, dizolvînd cca 2,2 g în 100 ml xilen.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile deparafinate se trec în apă distilată ;

2. Se colorează cu hematoxină 30—45 minute ;

3. Se spală cu apă de robinet, pînă la albastrirea secțiunilor (vezi pag. 126) ;
4. Se colorează cu soluția de crizoidină, 10 minute ;
5. Se spală rapid în alcool etilic 92% denaturat ;
6. Se deshidratează în alcool izopropilic prin scufundarea repetată a lamelor pînă nu se mai degajă apă ;

7. Se colorează cu Sudan III, cca 30 minute ;

8. Se spală cu xilen pur foarte scurt ;

9. Secțiunile se includ în rășină sintetică.

Efectul colorării. Peretii celulari, celulozici se colorează în albastru ; cei lignificați în galben, cutina în roșu.

Recomandări. Secțiunile deparafinate se colorează cu mai multe amestecuri : safranină-Lichtgrün, safranină albastru de anilină, safranină-albastru Astra, safranină-hematoxilină ș.a. Colorația prezentată mai sus este, de asemenea, foarte bună pentru evidențierea naturii chimice a peretilor celulari. Timpul exact de colorare cu hematoxilină (vezi punctul 2) se va determina prin tatonare. Atragem atenția asupra spălării cu alcool (punctul 5), după colorarea cu crizoidină. Prelungirea timpului peste cel necesar duce la eliminarea completă a crizoidinei din secțiuni.

4.6.40. HEMATOXILINA DELAFIELD

Substanțe necesare : hematoxilină, alcool etilic 95% (sau izopropanol) alaun de amoniu și aluminiu, NaIO_3 glicerină, metanol 100%, NaHCO_3 , HCl (0,1 în apă), apă distilată.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g hematoxilină în 6 ml alcool etilic 92%. Se adaugă apoi 100 ml soluție saturată de alaun de amoniu și aluminiu (4 g alaun la 100 ml apă), 0,2 g NaIO_3 , 25 ml glicerină și 25

ml metanol 100%. Rezultă o soluție de culoare roșu închis, care se poate păstra un timp îndelungat în sticle brune, închise cu dop rodat.

Tehnica de colorare :

1. Se spală preparatele cu apă distilată ;
2. Se introduc în colorant : în soluția nediluată 2—3 minute ; în soluția diluată cca 30 minute ;
3. Se spală colorantul cu apă distilată ;
4. Se spală cu apă de robinet sau NaHCO_3 (vezi pag. 193), pînă cînd secțiunile se colorează în albastru ;
5. După o prealabilă deshidratare, se montează în rășini sintetice cu $\text{pH}=7$;
6. În cazul supracolorării preparatelor, se folosește ca diferențiator HCl diluat (0,1% în apă).

Efectul colorării. Nucleele și citoplasma se colorează în albastru deschis ; pereții celulozici și pectina în albastru închis.

Recomandări. Colorarea cu hematoxilină Delafield este indicată în cercetarea vîrfurilor vegetative meristematice și nu se recomandă pentru preparatele totale (alge, ciuperci etc.).

Hematoxilina Delafield se păstrează un timp îndelungat în sticle bine închise, cu condiția ca din cînd în cînd soluția să fie filtrată. Rezultate foarte bune se obțin folosind hematoxilină Delafield diluată cu apă distilată în proporție de 1 : 10. În acest caz, timpul de colorare se stabilește experimental, prin tatonare.

4.6.41. HEMATOXILINA EHRLICH

Substanțe necesare : hematoxilină, alcool etilic 95% (sau izopropanol), glicerină, alaun de potasiu și aluminu, acid acetic glacial, NaIO_3 , NaHCO_3 HCl (0,1% în apă), apă distilată.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g hematoxină în 50 ml alcool etilic 95% călduț. Se adaugă apoi 50 ml apă distilată, 50 ml glicerină, 1,5 g alaun de potasiu și aluminiu, 5 ml acid acetic glacial și 0,2 g NaIO_3 . Soluția obținută are culoarea roșie-brună, iar după tratarea cu NaIO_3 devine roșie închis; ea poate fi imediat utilizată sau poate fi păstrată mai mult timp în sticle brune, închise cu dop rodar.

Colorarea poate fi făcută cu soluția de bază nediluată sau diluată în apă distilată în proporție de 1:3-5. În cazul când se schimbă culoarea soluției de bază (devine albastră), se procedează la acidularea ei cu acid acetic glacial pînă cînd își recapătă culoarea roșie-închis.

Tehnica de colorare :

1. Se spală bine preparatele sau materialele biologice totale (alge, ciuperci) cu apă distilată ;

2. Se introduc în soluția pregătită pentru 10—15 minute, în cazul soluției nediluate și peste 15 minute în cazul folosirii soluției diluate ;

3. Se spală colorantul cu apă distilată ;

4. Se spală în apă de robinet cu pH neutru, 15—30 minute sau cu NaHCO_3 (vezi pag. 194), pînă cînd materialul virează la culoarea albastră ;

5. După o prealabilă deshidratare, materialele se includ în rășini sintetice cu pH=7 ;

6. În cazul unei supracolorări, se diferențiază cu HCl diluat.

Efectul colorării. Nucleele se colorează în albastru închis, iar citoplasma în albastru-cenușiu slab.

Recomandări. Nu se vor folosi ca fixatori amestecuri cu acid cromic sau OsO_4 , deoarece dau rezultate slabe. Se recomandă, în vederea obținerii unui contrast mai

bun, folosirea soluțiilor diluate (1 parte soluție mamă la 3—5 părți apă distilată). Timpul exact de colorare se va stabili experimental, prin tatonare (vezi punctul 2).

4.6.42. HEMATOXILINA EHRLICH ȘI SAFRANINA

Substanțe necesare : hematoxină, safranină.

Modul de preparare. A se vedea hematoxină Ehrlich (pag. 194) și safranină.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile scoase din alcool 70 % sau 95%, alcool + glicerină, se spală cu apă, cu schimbarea de câteva ori a acesteia ;

2. Se colorează cu hematoxină Ehrlich 3—5 minute; colorarea se controlează la microscop, după o spălare prealabilă în apă distilată ;

3. Se spală de 3—5 ori cu apă distilată și de 2—3 ori cu apă de robinet ;

4. Secțiunile de culoare albastră se introduc în safranină pentru 5—10 minute (până la 12 ore) ;

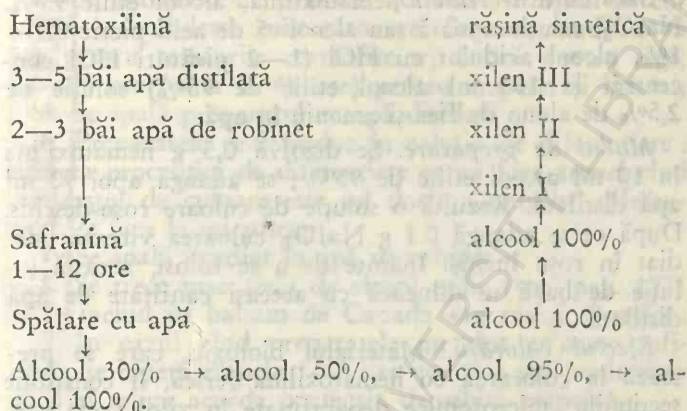
5. Se spală de mai multe ori cu apă până când ultima apă este incoloră ;

6. Secțiunile se trec prin mai multe băi de alcool etilic (30%, 50%, 70%, 95%), pentru diferențiere și deshidratare ; în fiecare concentrație se țin 3—5 minute, cu control la microscop ;

7. Când contrastul dintre culoarea albastră și roșul clar strălucitor este evident, secțiunile se trec în alcool absolut sau acetonă (de 2—3 ori) pentru 2—5 minute ;

8. Se trec secțiunile prin 3—5 băi de xilen și apoi se montează în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Tehnica de colorare cu hematoxină Ehrlich-safranină poate fi schematizată astfel :



Efectul colorării. Țesutul cambial, floematic, cortical, medular, razele medulare se colorează în albastru; țesuturile lignificate sînt incolore; nucleele se colorează în albastru închis spre negru.

Recomandări. Tehnica hematoxină-safranină descrisă se recomandă pentru materialele vegetale incluse în celoidină. Secțiunile intens colorate (vezi punctul 3) pot fi decolorate (diferențiate) cu HCl 50%, urmat de o spălare temeinică cu apă de robinet. Țesuturile lignificate se colorează cu safranină (vezi punctul 4); în 5—10 minute, cele s'ab lignificate în 10—12 ore.

În cazul cînd secțiunile trecute prin băile de xilen se rulează sau se bombează (sau cînd acest lucru se întîmplă în timpul colorării), se așază derulate în prealabil pe lamă într-o picătură de ba'sam de Canada cu concavitatea în jos, după care se pune lamela în poziție oblică. Pentru a evita rularea secțiunilor se recomandă înlocuirea xilenului cu terpineol.

4.6.43. HEMATOXILINA FERICĂ (D. HEIDENHAIN)

Substanțe necesare : hematoxină, alcool etilic 95%, NaIO_3 , soluție apoasă sau alcoolică de acid picric 0,5—1%, alcool acidulat cu HCl (1—2 picături HCl concentrat la 100 ml alcool etilic de 95%) soluție de 2,5% de alaun de fier și amoniu în apă.

Modul de preparare. Se dizolvă 0,5 g hematoxină în 10 ml alcool etilic de 95%; se adaugă apoi 90 ml apă distilată. Rezultă o soluție de culoare roșu-deschis. După ce se adaugă 0,1 g NaIO_3 , culoarea virează imediat în roșu închis. Înainte de a se folosi, această soluție de bază se diluează cu aceeași cantitate de apă distilată.

Efectul colorării. Materialul biologic, care se pretează la colorarea cu hematoxină ferică, îl constituie secțiunile microtomice deparafinate în xilol (vezi pag. 124), precum și materiale din alge, ciuperci sau licheni (preparate totale), dispuse în strat subțire pe lame.

Aceste preparate, se *mordansează*, în prima etapă, cu alaun de fier și amoniu, după care se *supracolorează* în negru uniform, cu o soluție de hematoxină maturată.

A treia etapă o constituie *diferențierea* (contrastarea, clarificarea) cu o soluție de diferențiere (vezi mai jos). Preparatele se lasă în soluția de diferențiere până când structurile pe care dorim să le cercetăm se separă complet de cele din jur. Controlul diferențierii structurilor se va face la microscop.

Tehnica de colorare :

1. Se spală preparatele cu apă distilată ;
2. Se trec în mordant (timpul de mordansare se calculează prin tatonări). Pentru meristeme se recomandă 2 ore, pentru alge 30 minute, pentru ciuperci 12 ore ;

3. Se spală mordantul, trecînd preparatele, repetat, prin apă de robinet și în final prin apă distilată ;

4. Se introduce în colorant (diluât) ; timpul de colorare se stabilește prin tatonare. Se recomandă 2—5 ore pentru țesuturile cormofite'or, 1 oră pentru alge, 12—24 ore (pîna la 48 ore) pentru ciuperci și licheni ;

5. Se spală preparatul cu apă distilată ;

6. Preparatele se introduc în soluția de diferențiere ; oprirea procesului de diferențiere se va face atunci cînd contrastul de culoare este cel dorit. Controlul diferențierii se face la microscop ;

7. Se spală imediat în apă de robinet ;

8. Se trece prin seria de alcool etilic (vezi pag. 127) și se includ în balsam de Canada sau rășini sintetice ;

9. În cazul cînd preparatele nu sînt colorate suficient, se repetă etapele 1—6 ; se vor ține mai mult timp în 4 și se va acorda o atenție deosebită etapei 6 ;

10. Dacă după aplicarea lamei, peste secțiunile colorate, acestea se decolorează, lamele se introduc în xilen pîna cînd lamelele se desprind și rășina de pe lamă se dizolvă în xilen. Apoi se trec prin seria de alcool etilic, pîna la apă și totul se reia de la 1—6 (vezi și etapa 9).

Efectul colorării. Cromozomii, cromatina, mitocondriile, proplastidele, miceliile ciupercilor se colorează, în funcție de diferențiere, de la negru-albăstrui la gri închis.

Citoplasma se colorează cenușiu, gălbui sau se colorează foarte slab ; pereții celulari lignificați rămîn incolori.

Recomandări. Colorația cu soluții de hematoxină și mordant separate se recomandă în cercetările de citologie, histologie și embriologie, atît la talofite cît și la cormofite. Nu dau rezultate bune secțiunile sau frotiurile cu grosimi variabile sau care depășesc 10—15 μ în grosime.

Contrastul puternic al secțiunilor se realizează numai după o supracolorare și diferențiere cu control la microscop corespunzătoare. Aceste două etape solicită timp; ele vor fi practicate numai atunci când dorim să evidențiem structuri extrem de fine.

Recomandăm ca atât soluția de bază cât și cea de lucru (soluție de bază + apă 1 : 1) să se păstreze în sticle bine închise.¹ Soluțiile vechi au culoarea mai negricioasă, spre deosebire de cele proaspete; pentru meristeme se recomandă soluții proaspete, iar pentru talofite cele vechi (mature).

Una din etapele foarte importante în colorarea cu hematoxilină ferică o reprezintă *diferențierea* (contrastarea). Așa cum s-a arătat, aceasta se face controlînd preparatele la microscop. Se recomandă, în timpul diferențierii, agitarea din cînd în cînd a soluției. Aceasta va conduce la contrastarea uniformă a secțiunilor sau preparatelor totale.

Diferențierea se face utilizînd, după scop, următoarele soluții :

— soluție apoasă sau alcoolică de acid picric 0,5—1%, soluție de alcool acidulat cu HCl, în cazul în care dorim să obținem cromozomi puternic colorați, întunecați pe un fond de citoplasmă incoloră ;

— se mai folosește ca mordant, soluția proaspătă (sau de 1—2 săptămîni) de 2,5% alaun de fier și amoniu în apă ; în acest caz, nucleul apare întunecat, iar citoplasma ușor colorată.

Indiferent de mordantul folosit, soluțiile concentrate acționează mai repede decît cele slabe. Nu recomandăm folosirea de soluții concentrate, deoarece diferențierea este atît de rapidă încît nu este posibilă oprirea la timp a procesului (valabil pentru începători).

* În aceste condiții, soluțiile rezistă cîteva luni de zile.

În toate cazurile, controlul la microscop al diferențierii este obligatoriu.

D. Gerlach (1977) recomandă următoarea soluție de diferențiere :

alaun de fier și amoniu (4% în apă)	500 ml
acid acetic glacial	5 ml
acid sulfuric (10%)	6 ml

Această soluție are avantajul că se poate păstra luni de zile și contrastează foarte bine preparatul.

Cele mai bune colorări se obțin atunci când materialul biologic a fost fixat în alcool, formol sau acid picric. În cazul când s-au folosit ca fixatori amestecuri cu acid cronic, se recomandă decromarea cu acid oxalic și KMnO_4 . De cele mai multe ori, chiar decromate, materialele astfel fixate se colorează slab cu hematoxilină.

Tehnica regresivă de colorare cu hematoxilină duce la obținerea unui contrast superior comparativ cu cea progresivă.

4.6.44. HEMATOXILINĂ - MORDANT (HEMALAUNUL MAYER)

Substanțe necesare : hematoxilină, alaun de potasiu și aluminiu, NaIO_3 , cloralhidrat, acid citric, acid acetic glacial, HCl (0,1% în apă), amoniac concentrat.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g de hematoxilină în 1000 ml soluție apoasă de alaun de potasiu și aluminiu 5%, după care se adaugă ca oxidant, 0,2 g NaIO_3 . Soluția trece din roșu deschis în roșu închis. Din soluția mamă (de bază) se scot 100 ml și se tratează cu 5 g cloralhidrat și 0,1 g acid citric.

În cazul când dorim mai mare contrast al nucleului față de citoplasmă, adăugăm celor 100 ml soluție încă 2 ml de acid acetic glacial.

Soluția astfel pregătită se poate utiliza imediat sau se poate păstra un timp îndelungat în sticlă închisă cu dop rodant și folosi la nevoie.

Tehnica de colorare :

1. Se spală bine preparatele sau materialele biologice totale (alge, ciuperci) cu apă distilată ;

2. Se introduc în soluția pregătită 5—10 minute* ; în acest timp se colorează în roșu bordo ;

3. Se spală cu apă distilată, pînă la eliminarea completă a colorantului din țesuturi ;

4. Se spală în apă de robinet, cu pH neutru, 15—30 minute (cu schimbarea de cîteva ori a apei) ; de la roșu bordo culoarea virează la albastru ;

5. Structurile colorate în albastru (și nu albastru cu tentă roșie) se includ în rășini sintetice după deshidratare, prin seria de alcool-xilol.

Efectul colorării. Nucleeele se colorează în albastru închis, citoplasma într-o nuanță mai slabă de albastru, iar pereții celulari în cenușiu sau slab albastrui.

Recomandări. Adesea materialele biologice nu se colorează bine din cauza pereților celulari care nu permit pătrunderea colorantului în interiorul celulelor. În acest caz se va folosi alt colorant (de exemplu, hematoxilină Ehrlich).

Se recomandă, ca fixatori, amestecurile *fără acid cronic* sau tetraoxid de osmiu. În etapa a patra a tehnicii de colorare, în cazul cînd nu are loc virarea culorii de la roșu la albastru, se recomandă folosirea unei soluții apoase de NaHCO_3 , 0,5—0,1 %.

În cazul cînd preparatele sînt supracolorate (albastru întunecat), se recomandă tratarea acestora cu o soluție apoasă de HCl , 0,1 %. Are loc virarea rapidă a

* Durata exactă se stabilește experimental, prin tatonări și control la microscop.

culorii de la albastru închis la roșu. Pentru albăstrire se introduce preparatul imediat într-o soluție diluată de amoniac (1 picătură amoniac la 100 ml apă distilată). După albăstrire, se spală 10—15 minute cu apă de robinet des schimbată ; se deshidratează și se include în rășină sintetică.

În cazul când preparatele sînt decolorate, în urma unei diferențieri prelungite, se vor lăsa în HCl diluat (0,1%) în apă pînă la decolorarea completă, apoi se vor trata 15—30 minute cu soluție de amoniac tot atît timp cu apă de robinet, după care se începe cu punctul 1.

4.6.45. IOD ÎN IODURĂ DE POTASIU (SOLUȚIE IODO-IODURĂ)

Substanțe necesare : iodură de potasiu, iod metalic cristalizat.

Modul de preparare : Se dizolvă 1 g iodură de potasiu într-un ml apă distilată. În această soluție se dizolvă și 1 g (0,25 g) iod metalic. După completa dizolvare, se adaugă apă distilată pînă la 100 ml.

Tehnica de colorare :

1. Se introduc țesuturile vegetale în soluție, pentru 3—5 minute.

2. Se spală cu apă de robinet, de mai multe ori schimbată.

3. Se analizează la microscop.

Efectul colorării. Soluția de IIK colorează amidonul în nuanțe de albastru închis pînă la albastru-roșiatic ; chitina este colorată în roșu-violet, nucleele în albastru-violet, iar plastidele în negru.

Recomandări. Cu aceleași rezultate se poate utiliza soluția Lugol.

4.6.46. LACTOFENOL ȘI ALBASTRU DE ANILINĂ

Substanțe necesare : acid lactic, glicerină, fenol, albastru de anilină.

Modul de preparare : Se prepară două soluții, A și B, astfel :

Soluția A : se dizolvă 80 g glicerină, 40 g acid lactic și 80 g fenol în 40 ml apă distilată. Se obține lactofenolul, care poate fi păstrat sub această formă un oarecare timp ;

Soluția B : 1 g albastru de anilină la 100 ml lactofenol.

Tehnica de colorare :

1. Materialul fixat în AFE (alcool fenol-acetic) sau decolorat cu alcool, se introduce în lactofenol, unde rămîne pînă devine translucid (de la o zi pînă la cîteva zile) ;

2. Se introduce în albastru de anilină cu lactofenol, se fierbe puțin și se mai lasă în soluția fierbinte încă 2 minute ;

3. Se mai trece o dată în lactofenol ; se mai fierbe scurt timp și se lasă în soluția fierbinte 1—2 minute ;

4. Materialul se include pe o lamă în lactofenol, după care preparatul se lutează.

Efectul colorării. Plasma hifelor miceliene se colorează în albastru intens ; adesea nucleele sînt de un albastru intens. Tesuturile plantei gazdă rămîn incolore.

Recomandări. Colorația pune în evidență traseul hifelor în corpul plantelor superioare, cu condiția ca acestea să fi fost fixate în AFE. Înainte de colorare, materialul se va decolora în alcool 70%, timp de 1—2 zile (procesul se accelerează la 50°C la termostat).

4.6.47. SOLUȚIA LUGOL

Substanțe necesare : KI, I, H_2SO_4 (1 parte apă la 2 părți H_2SO_4 concentrat).

Modul de preparare. Se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă distilată, după care se dizolvă 1 g de iod.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile de mână se pun într-o sticlă de ceas, în soluție lugol, 10 minute ;

2. Se pun pe lamă 2—3 secțiuni într-o picătură de soluție Lugol și se acoperă cu lamela ;

3. Se aspiră prin preparat acid sulfuric diluat ;

4. Se analizează la microscop. Preparatele se pot lăsa (vezi pag. 73).

Efectul colorării. Pereții celulari de natură celulozică se colorează în albastru ; lemnul, suberul și cutina în galben.

Recomandări. Colorația cu soluție Lugol este mult mai sigură decât cea cu cloriodură de zinc, dar mai puțină utilizată. Soluția Lugol se recomandă, cu rezultate foarte bune, și pentru identificarea amidonului, pe care îl colorează în albastru închis până la negru.

4.6.48. COLORAȚIA CU MUCICARMIN

Substanțe necesare : alizarinviridină, carmin, $AlCl_3$, alcool etilic 50%.

Modul de preparare. Soluția de alizarinviridină și alaun de crom se prepară după indicațiile de la pag. 162. Pentru prepararea soluției de mucicarmin se amestecă 1 g carmin pulvis cu 0,5 g $AlCl_3$ și 2 ml apă distilată. Se încălzește două minute la o flacără slabă. Se adaugă apoi 100 ml alcool etilic 50%. Pentru lucru se face o

diluție a soluției de bază în apă distilată în proporție de 1 : 9.

Tehnica de colorare :

1. Materialul fixat, după P f e i f f e r, se colorează cu alizarinviridină ;
 2. Se spală cu apă de robinet de câteva ori schimbată ;
 3. Se colorează cu soluția diluată de mucicarmin, timp de 2—8 ore ;
 4. Se spală cu apă distilată ;
 5. Se include în gelatină glicerinată.
- Efectul colorării.* Tecile mucilaginoase ale cianoficeelor se colorează în roșu, iar citoplasma în verde.

4.6.49. NIGROSINA ȘI ACIDUL PICRIC

Substanțe necesare : acid picric, nigrosină.

Modul de preparare. Într-un balon Erlenmeyer de 500 ml se pune un strat de cca 1 cm grosime de acid picric cristalizat și apoi se adaugă apă distilată.

Se agită mai mult timp, pînă cînd acidul picric se dizolvă aproape în întregime.

Din această soluție saturată se iau 90 ml și se amestecă cu 10 ml de soluție apoasă 10% de nigrosină.

Tehnica de colorare :

1. Se așază algele într-un vas și se acoperă cu soluția colorantă ; se lasă în contact 5 minute ;
2. Se analizează la microscop într-o picătură de picro-nigrosină, apoi se microfotografiază.

Efectul colorării. Nucleele și nucleolii se colorează în nuanțe de negru ; plastidele se colorează în gri-gălbui.

Recomandări. Colorarea (vezi punctul 1) se poate face și direct pe lamă, dar această tehnică nu se recomandă. Colorația cu nigrosină și acid picric dă rezultate bune și în cercetările de micologie.

4.6.50. ORCEINĂ ȘI ACIDUL ACETIC

Substanțe necesare : orceină, acid acetic 50% (se poate utiliza cu rezultate bune acidul propionic).

Modul de preparare. Se dizolvă, prin încălzire, 1 g orceină în 100 ml acid acetic 50%. După răcire, soluția se filtrează și se utilizează imediat.

Tehnica de colorare și recomandările sînt cele prezentate la colorația cu acetocarmin.

4.6.51. COLORAȚIA PIANESE

Substanțe necesare : verde malahit, fuchsină acidă, galben Martius, alcool etilic 95%, acid acetic glacial, alcool izopropilic absolut.

Modul de preparare. Se prepară 3 soluții, A, B și C, astfel :

Soluția A : 0,5 g verde malahit în 50 ml apă distilată ;

Soluția B : se dizolvă 0,5 g fuchsină acidă în 10 ml apă distilată ;

Soluția C : se dizolvă 0,01 g galben Martius în 1 ml apă distilată.

Se amestecă cele 3 soluții și se completează cu 89 ml apă distilată și 50 ml alcool etilic 95%.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile deparafinate se trec din apă distilată în soluția de colorant, cel puțin 45 minute ;

2. Se scurge excesul de colorant și se spală scurt timp în alcool de 95% ;

3. Secțiunile se diferențiază 1 minut într-un amestec alcătuit din 99 ml alcool de 95% și 1 ml acid acetic glacial ;

4. Se deshidratează cu alcool izopropilic absolut ;

5. Se include în rășină sintetică.

Efectul colorării. Hifele miceliene se colorează în roz strălucitor, iar celulele gazdei în verde.

Recomandări. Colorația Pianese este des folosită pentru punerea în evidență a hifelor miceliene din țesuturile plantelor superioare. Materialul se împarafinează, iar colorația se efectuează pe secțiuni microtomice seriata.

4.6.52. RODAMINA B

Substanțe necesare : rodamină B.

Modul de preparare. Se dizolvă 0,1 g rodamină în 100 ml apă de robinet cu pH=7.

Tehnica de colorare :

1. Țesuturile vii se introduc în colorant, 10 minute ;

2. Se spală cu apă de robinet (sau cu soluție pH=7) ;

3. Într-o picătură din aceeași soluție se introduce fragmentul epidermal și se analizează la microscop.

Efectul colorării. În lumină albastră, membranele nucleelor ca și mitocondriile prezintă o fluorescență galbenă ; citoplasma prezintă o fluorescență palid galbuie.

Recomandări. Colorația cu rodamină B se recomandă în cercetările pe materiale vii (epiderma frunzelor bulbului de ceapă ș.a.). Atenție mare trebuie acordată pH-ului apei.

Pentru contrastarea puternică a membranelor nucleare, țesutul colorat cu rodamină B se fluorocromează cu tetraciclina.

4.6.53. ROȘU DE CONGO ȘI CRIZOIDINĂ (REACTIVUL GENEVEZ)

Substanțe necesare : crizoidină, roșu de Congo, alcool etilic 95%, amoniac.

Modul de preparare. Se prepară două soluții, A și B, astfel :

Soluția A : se dizolvă 1 g crizoidină în 100 ml alcool etilic 95% sau 0,5 g crizoidină în 100 ml apă distilată.

Soluția B : se dizolvă 3 g roșu de Congo în 100 ml apă distilată, apoi se adaugă 5 ml de amoniac sau 5 g roșu de Congo, la care se adaugă aceleași cantități de apă și amoniac.

Soluțiile se lasă în repaus 1—2 zile la temperatura camerei, pentru dizolvarea completă a substanțelor, apoi cele două soluții se amestecă în proporții egale. După 2—3 zile de repaus, se filtrează și apoi se utilizează.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile de mînă javelizate în prealabil se spală bine cu apă de robinet ;

2. Se colorează cu roșu de Congo și crizoidină, 3—5 minute ;

3. Se spală cu apă de robinet pînă cînd nu se mai degajă colorant ;

4. Se includ în gelatină glicerinată și se lutează.

Efectul colorării. Pereții celulozici și mucilagiile se colorează în roșu ; pereții suberificați în brun-gălbui ; citoplasma se colorează în roșu slab.

Recomandări. Colorantul se păstrează mai mult timp în sticle brune cu dop rotat.

4.6.54. ROȘU DE NUCLEU

Substanțe necesare : roșu de nucleu, sulfat de aluminiu.

Modul de preparare. Se prepară o soluție de roșu de nucleu și sulfat de aluminiu, dizolvând 0,1 g roșu de nucleu într-o soluție de 5% sulfat de aluminiu, prin fierbere. După răcire, soluția se filtrează și se păstrează în sticle cu dop rodat.

Tehnica de colorare :

1. Materialul biologic se spală după fixare și se introduce în colorant 1—2 zile ; se va evita supracolorarea ;

2. Se spală cu apă distilată ;

3. Se include în rășini sintetice, după o prealabilă deshidratare.

Efectul colorării. Organitele celulare se colorează în nuanțe de roz-roșu ; pereții celulari nu se colorează.

Recomandări. Colorația cu roșu de nucleu se folosește atât în histologie cât și pentru talofite la realizarea preparatelor totale. Colorantul poate fi utilizat imediat după preparare sau se poate păstra timp îndelungat. Rezultate bune se obțin după o fixare cu un amestec de bază de acid cronic.

Preparatele colorate obținute se pot monta în glicerină, sau gelatină glicerinată.

4.6.55. ROȘU DE RUTENIU

Substanțe necesare : roșu de ruteniu, apă de Javelle.

Modul de preparare. Se dizolvă 0,02 g roșu de ruteniu în 100 ml apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Materialul fixat se secționează cu briciul sau cu lama ;

2. Secțiunile de mână se javelizează într-o capsulă de porțelan, 3—5 minute ;

3. Se spală cu apă distilată (cu schimbarea acesteia de câteva ori) ;

4. Secțiunile se colorează direct pe lamă sau într-o capsulă de porțelan ;

5. Se analizează la microscop.

Efectul colorării. Substanțele pectice din pereții celulari și lamelele mijlocii se colorează în roșu carmin.

Recomandări. Rezultate foarte bune se obțin după o fixare a materialului, supus colorării, cu alcool sau alcool-formol-acid acetic.

Rezultate concludente se obțin colorînd secțiunile cu soluția apoasă de *safranină* (1 g la 100 ml apă distilată) ; substanțele pectice se colorează în brun-galben-portocaliu sau cu soluția apoasă de albastru de metilen (1 g la 100 ml apă distilată). În acest ultim caz, substanțele pectice se colorează în albastru.

4.6.56. SAFRANINĂ ȘI ALBASTRU DE ANILINĂ

Substanțe necesare : safranină, albastru de anilină, alcool etilic 50%, alcool izopropilic 95%.

Modul de preparare. Se pregătesc două soluții alcoolice, A și B, astfel :

Soluția A : se dizolvă 1 g safranină în 100 ml alcool etilic 50% ;

Soluția B : se dizolvă 0,5 g albastru de anilină în 100 ml alcool etilic 50%, după care se filtrează.

Tehnica de colorare :

1. Lamele deparafinate se introduc în safranină, 24 ore ;

2. Se spală în apă de robinet (cu schimbarea apei de câteva ori), pînă cînd apa rămîne incoloră ;

3. Se spală (prin scufundare repetată) în alcool etilic 50% până când nu se mai observă degajări de colorant ;

4. Se colorează cu soluție proaspătă de albastru de anilină, 15 secunde ;

5. Se spală cu alcool izopropilic 95%, prin scufundare repetată în pahare Borel ;

6. Includerea în rășini sintetice.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați se colorează în roșu ; citoplasma și pereții celulari celulozici se colorează în albastru.

Recomandări. Combinația safranină-albastru de anilină se pretează la punerea în evidență a peretilor celulari slab lignificați. Se recomandă, în general, în cercetările de anatomie la cormofite. În cazul când soluția de albastru de anilină este veche, se prelungește timpul de colorare (vezi punctul 4).

4.6.57. SAFRANINA ȘI FAST GREEN (VERDE RAPID)

Substanțe necesare : safranină, alcool etilic 50% și 95%, fast green, alcool izopropilic 95%.

Modul de preparare. Se prepară două soluții alcoolice, A și B :

Soluția A : se dizolvă 1 g safranină în 100 ml alcool etilic 50%.

Soluția B : se dizolvă 1 g fast green în 100 ml alcool etilic 95%.

Tehnica de colorare :

1. Lamele deparafinate, se trec din alcool etilic de 50% în soluția alcoolică de safranină timp de 24 ore ;

2. Se spală în apă de robinet (cu schimbarea apei de câteva ori) până când apa rămîne incoloră ;

3. Se spală în alcool etilic de 95%, în pahare Borel, până când nu se mai observă degajări de colorant ;

4. Se colorează cu soluție de fast green 5—10 secunde ;

5. Se spală cu alcool izopropilic 95% (nu în alcool etilic) prin scufundarea repetată a lamelor ;

6. Secțiunile se montează în rășini sintetice.

Efectul colorării (vezi efectul colorării la safranină-Lichtgrün).

Recomandări. Se recomandă în cercetările cito-histo-embriologice, în cercetările de micologie ș.a. Preparatele obținute după această combinație de coloranți sînt mult mai durabile decît cele realizate cu safranină-Lichtgrün.

În toate colorațiile cu safranină se recomandă fixarea materialelor în amestecuri cu acid cronic. În cazul utilizării altor fixatori, se recomandă o mordansare prealabilă a lamelor deparafinate cu acid cronic 1% în apă, cca 5 ore. După mordansare, lamele se spală în apă de robinet (cu schimbarea apei de cîteva ori), apoi în apă distilată, după care se colorează în combinațiile cu safranină.

4.6.58. SAFRANINA ȘI LICHTGRÜN (VERDE LUMINOS)

Substanțe necesare : safranină, alcool etilic 50%, Lichtgrün, alcool izopropilic 95%.

Modul de preparare : Din substanțele amintite se pregătesc două soluții, A și B.

Soluția A : se dizolvă 1 g safranină în 100 ml alcool etilic 50%. Soluția se poate folosi imediat sau se poate păstra un timp îndelungat în sticle cu dop rodat, cu condiția să fie filtrată din cînd în cînd.

Soluția B : se dizolvă 0,5 g Lichtgrün (sau Echtgrün) în 100 ml alcool etilic 50%. Se pregătește scurt timp înainte de a fi folosită.

Tehnica de colorare :

1. Lamele deparafinate se trec din alcoolul etilic de 50% în soluția alcoolică de safranină pentru 24 ore ;

2. Se spală în apă de robinet (cu schimbarea apei de câteva ori) pînă cînd apa rămîne incoloră ;

3. Se spală în alcool de 95%, în pahare Borel, prin scufundare repetată, pînă cînd nu se mai observă degajări de colorant ;

4. Se introduc lamele în Lichtgrün pentru colorare și diferențiere ; se țin în colorant pînă cînd capătă culoarea gri-albăstrui ;

5. Se spală cu alcool izopropilic 95% (nu cu alcool etilic), în pahare Borel, prin scufundare repetată a lamelor ;

6. Secțiunile se montează în rășini sintetice.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați, nucleeele, cromozomii, nucleolii se colorează în roșu ; citoplasma, membranele nucleare și pereții celulari celulozici se colorează în verde.

Recomandări. Combinația safranină-Lichtgrün se recomandă în cercetările de citologie, anatomie, în studiul ciupercilor și chiar în embriologie. Atunci cînd soluția de Lichtgrün este proaspătă (vezi punctul 4), lamele se lasă în contact cca 30 secunde. De altfel, colorarea cu Lichtgrün se controlează la microscop. Cînd preparatele au căpătat culoarea verde-crud este un indiciu că s-au supracolorat. Cu cît soluția este mai folosită, cu atît timpul de colorare va fi mai lung. Nu se recomandă utilizarea unei soluții de Lichtgrün învechită, deoarece depreciază colorația anterioară.

4.6.59. SAFRANINA - VIOLET CRISTAL - LICHTGRUN

Substanțe necesare : safranină, violet cristal (poate fi înlocuit cu violet de metil sau violet de gențiana), Lichtgrün, alcool etilic 50%, 95% sau alcool izopropilic de aceleași concentrații.

Modul de preparare. Se pregătesc 3 soluții diferite : A, B și C, astfel :

Soluția A : se dizolvă 3 g safranină în 100 ml alcool etilic 50% sau în alcool izopropilic. Soluția se poate păstra timp îndelungat cu condiția filtrării ei periodice ;

Soluția B : se dizolvă 1 g violet cristal în 100 ml apă distilată, după care se filtrează ;

Soluția C : se dizolvă 0,5 g Lichtgrün în 100 ml alcool 95%, soluția se prepară înainte de întrebuințare.

Tehnica de colorare :

1. Lamele deparafinate se trec din alcool de 95% în soluția alcoolică de safranină, unde se lasă 1 oră ;

2. Se spală în apă de robinet (cu schimbarea de câteva ori a acesteia) ;

3. Lamele spălate se introduc în soluția B, 1—2 minute ; violetul cristal joacă rol atît de colorant cît mai ales de diferențiator pentru safranină ;

4. Se spală în apă distilată prin scufundări repetate în pahare Borel ;

5. Se spală în alcool de 95% pînă cînd nu se mai observă degajări de colorant ;

6. Lamele se introduc în soluția C pentru câteva secunde (vezi recomandări) ;

7. Colorarea cu Lichtgrün se întrerupe prin introducerea lamelor în alcool izopropilic 95%, se scufundă repetat pînă cînd nu se mai observă degajări de colorant ;

8. Secțiunile se includ în rășini sintetice.

Efectul colorării. Pereții celulari celulozici, placa celulară în fragmoplast și citoplasma se colorează în verde, cromozomii, nucleolii, pereții celulari lignificați se colorează în roșu. Adesea pereții lignificați, cromo-

zomii și granulele de amidon apar în violet (cînd soluția B a acționat prea mult).

Recomandări. Colorația tricromă de mai sus se recomandă în cercetările cito-histo-embriologice. Rezultate bune se obțin și în cercetările de micologie. Se recomandă drept colorație de control în tehnica de colorație cu hematoxilină ferică.

În loc de violet cristal se pot folosi: violet de metil sau violet de gențiana. În acest caz, se obține o nuanță roșiatică în loc de albăstruie. În cercetările de citologie, la evidențierea fazelor mitotice se recomandă imersarea timp de 1—2 minute în soluția B. În alte situații, timpul de colorare se va prelungi pînă la 5 minute. Ca fixatori se recomandă amestecuri cu acid cromic.

O atenție deosebită se va acorda imersării în Lichtgrün; prelungirea timpului de colorare, peste timpul necesar, conduce la colorarea totală în verde a lamelor, dacă acționează prea puțin, membranele celulozice și citoplasma rămîn colorate în roșu sau vio-

4.6.60. SAFRANINA – VIOLET DE METIL ȘI FAST GREEN (D. JOHANSEN)

Substanțe necesare: safranină, eter monometilic a etilenglicolului, alcool etilic 95%, acetat de sodiu, formol, violet de metil, fast green, butanol terțiar, acid acetic glacial, Orange G, ulei de cuișoare, alcool izopropilic absolut, xilen, formol 40%.

Modul de preparare. Se prepară 7 soluții: A—G, în felul următor:

Soluția A: se dizolvă 1 g safranină în 50 ml de eter monometilic; se adaugă apoi 25 ml de alcool etilic de 95%, 25 ml apă distilată, 1 g de acetat de sodiu și 2 ml de formol 40%.

Soluția B: se face o soluție apoasă din dizolvarea în 100 ml de apă distilată a 1 g violet de metil (violet de gențiana);

Soluția C: se face o soluție, din părți egale, de alcool etilic 95%, eter monometilic de glicol și butanol terțiar (alcool butilic secundar);

Soluția D: 0,2 g fast green se dizolvă în 50 ml amestec egal de ulei de cuișoare + eter monometilic. Se adaugă apoi 60 ml alcool etilic 95%, 160 ml butanol terțiar și 0,6 ml acid acetic glacial;

Soluția E: se amestecă 30 ml alcool etilic 95% cu 30 ml butanol terțiar și 0,15 ml acid acetic glacial;

Soluția F: se dizolvă 0,2 g Orange G într-o soluție saturată din 20 ml eter monometilic, la care se mai adaugă apoi 20 ml eter monometilic și 20 ml alcool etilic 95%;

Soluția G: se face o soluție din părți egale de ulei de cuișoare, xilen, alcool izopropilic 100%.

Tehnica de colorare:

1. Lamele deparafinate se trec din alcool de 95% în soluția A, unde vor rămâne 24—48 ore;

2. Se spală în apă de robinet (cu schimbarea de câteva ori a apei);

3. Se colorează cu soluția B timp de 10—15 minute;

4. Se spală în apă de robinet;

5. Lamele se introduc în soluția C pentru 15 secunde;

6. Se colorează cu soluția D timp de 10 minute;

7. Se introduce în soluția E, în vederea înlăturării excesului de colorant;

8. Se colorează cu soluția F circa 3 minute;

9. Lamele se introduc în amestecul G pentru câteva minute;

10. Se degresează în xilen (xilen I., xilen II.);

11. Se montează în balsam de Canada sau rășini sintetice.

Efectul colorării. Pereții celulozici, citoplasma, endoderma cu îngroșările Casparay se colorează în portocaliu ; plastidele în verde sau violet ; lamela mijlocie, hifele miceliene se colorează în verde ; nucleoplasma se colorează în verde deschis sau rămîne incoloră ; cromozomii, pereții celulari lignificați și suberificați în roșu ; nucleolii în roșu sau violet ; cromatina profazică în violet (adesea și granulele de amidon).

Recomandări. Colorația cvadruplă se recomandă în cercetările structurilor complexe, în special în identificarea hifelor fungale din diferite organe vegetative, precum și în cercetarea structurii unor licheni.

4.6.61. SUDAN III ȘI SUDAN IV

Substanțe necesare : Sudan III, Sudan IV, alcool etilic 95%, glicerină.

Modul de preparare. Se dizolvă 2 g de colorant în 100 ml alcool etilic 95%, apoi se amestecă 5 ml din soluția concentrată de colorant cu 5 ml glicerină.

Tehnica de colorare :

1. Secțiuni de mîna se pun pe lamă într-o picătură de colorant și se acoperă cu lamela ;
2. Se încălzește ușor la flacără slabă ;
3. Se adaugă pe sub lamelă o picătură de glicerină diluată și se examinează la microscop. Pentru păstrare, preparatele se lutează.

Efectul colorării. Suberul și cutina se colorează în roșu.

Recomandări. Colorația cu Sudan III este ceva mai slabă și ușor gălbuie. De aceea se recomandă folosirea colorantului Sudan IV.

4.6.62. SULFAT DE ANILINĂ

Substanțe necesare : sulfat de anilină, acid sulfuric.

Modul de preparare : Se dizolvă 6 g de anilină în 100 ml acid sulfuric 0,5% în apă.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile de mînă se așază într-o capsulă de porțelan cu soluție de sulfat de anilină, 2—3 minute ;
2. Se scot dîn colorant, se așază pe o lamă și se acoperă cu lamela ;
3. Se analizează la microscop imediat sau după lustrare.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați se colorează în galben.

Recomandări. Colorația cu sulfat de anilină se aplică secțiunilor efectuate cu briciul sau cu lama de ras. Colorarea se poate efectua direct pe lamă, aspirînd o picătură de reactiv pe sub lamela unde se află secțiunile.

4.6.63. TANIN ȘI CLORURĂ FERICĂ

Substanțe necesare : tanin, FeCl_3 .

Modul de preparare. Se prepară două soluții, A și B, astfel :

Soluția A : se dizolvă 1 g tanin în 100 ml apă, la care se adaugă un cristal de timol ;

Soluția B : se dizolvă 3 g FeCl_3 în 100 ml apă.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile se introduc în apă distilată ;
2. Se colorează cu tanin 10 minute ;
3. Se spală cu apă de robinet, de cîteva ori schimbata ;
4. Se introduce în soluția B pentru 3—5 minute ;

5. Se spală cu apă de robinet de cîteva ori schimbată ;

6. Se trece la deshidratarea în seria de alcool etilic, numai în cazul că pereții celulelor meristematice s-au colorat în negru închis ;

7. Vîrfurile vegetative meristematice sau secțiunile făcute prin ele, se includ în rășină sintetică.

Efectul colorării. Pereții celulelor meristematice se colorează în albastru închis pînă la negru. Adesea citoplasma se colorează și ea (ceva mai slab).

Recomandări. Colorarea cu tanin și clorură ferică se recomandă pentru cercetările referitoare la meristeme. În cazul cînd, după tratarea cu FeCl_3 , pereții celulari nu apar colorați în negru închis, se repetă etapele 1—5, pînă cînd se obține colorația dorită.

4.6.64. TANIN – CLORURĂ FERICĂ – HIDROXID DE SODIU

Substanțe necesare : tanin, FeCl_3 , NaOH .

Modul de preparare. Se prepară 3 soluții, astfel :

Soluția A : se dizolvă 10 g NaOH în 100 ml apă distilată ;

Soluția B : se dizolvă 1 g tanin în 100 ml apă distilată, la care se adaugă un cristal de timol ;

Soluția C : se dizolvă 1,5 g FeCl_3 în 100 ml apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Țesuturile meristematice se introduc în NaOH , 24—48 ore la 60°C (în etuvă) ;

2. Se spală cu apă de robinet, de cîteva ori schimbată ;

3. Se colorează cu tanin, 1 minut ;

4. Se spală cu apă de robinet care se schimbă de cîteva ori ;

5. Se introduce materialul în FeCl_3 cca 30 secunde, când devine negru-albăstrui ;

6. Se spală bine cu apă de robinet ;

7. Se deshidratează în alcool etilic 50%, 70%, 85%, 95%, 100% ;

8. Se include în rășină sintetică (Rhenohistol).

Efectul colorării. Pereții celulari se colorează în negru albăstrui ; elementele xilemice sînt evident contrastate.

Recomandări. Rezultate bune se obțin cu materiale fixate în prealabil în alcool-formol-acid acetic. Pentru ca soluțiile succesive să pătrundă ușor în vîrfurile vegetative meristematice, acestea se eliberează de catafile.

Este foarte importantă spălarea materialului după scoaterea lui din NaOH. Dacă timpul nu ne permite (vezi punctul 2), materialele se pot păstra în alcool 70%.

Dacă se urmărește să se mărească contrastul colorării, se supracolorează cu safranină, astfel :

— Obiectele se introduc 5—30 secunde într-o soluție de safranină (0,5 g safranină în 50 ml xilen și 50 ml alcool izopropilic) ;

— Se spală imediat cu alcool-xilen. Pereții celulari lignificați se colorează în roșu.

4.6.65. VERDE DE IOD

Substanțe necesare : verde de iod, acid acetic glacial, timol.

Modul de preparare. Se dizolvă 1 g verde de iod în 100 ml apă distilată. După dizolvare, se adaugă 3 (4) ml acid acetic glacial și un cristal de timol.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile javelizate se spală cu apă de robinet acidulată (1% cu acid acetic), de câteva ori schimbată ;

2. Se introduc în colorant, câteva secunde ; se spală cu apă de robinet, apoi cu alcool 95% ;

3. Se montează în gelatină glicerinată sau se analizează imediat.

Efectul colorării. Pereții celulari se colorează în verde intens, iar nucleeele în verde-galben. Citoplasma se colorează în verde-pal.

Recomandări. Verdele de iod se poate prepara și în soluție alcoolică.

4.6.66. VERDE RAPID (vezi pag. 177)

4.6.67. VIOLET DE GENȚIANĂ FENICAT

Substanțe necesare : violet de gențiana (metilviolet sau cristal violet), fenol cristalizat, alcool etilic 70%.

Modul de preparare. Același ca la fuchsina fenicată.

Tehnica de colorare este aceeași ca la fuchsina fenicată.

Efectul colorării. Colorează în violet cocii, bacilii și spirili.

Recomandări. În cazul când dorim să montăm în rășină microorganismele de pe lamă, pentru conservare, se aplică pe frotiul uscat o picătură de Entellan sau altă rășină și se acoperă cu lamela. D. Gerlach, (1977), recomandă acoperirea frotiului cu o peliculă de Merckoglas (masă sintetică), care se întinde prin balansarea lamei. Recomandările sînt valabile pentru albastru de metilen, fuchisină fenicată și violet de gențiana fenicată.

4.6.68. VERDE DE METIL ȘI PIRONINA

Substanțe necesare : verde de metil, cloroform, pironină G.

Modul de preparare. Se prepară două soluții apoase, A și B, astfel :

Soluția A : se dizolvă 1 g verde de metil în 50 ml apă distilată ; se amestecă apoi cu cloroform, se agită pînă cînd soluția devine incoloră.

Soluția B : se dizolvă 1 g pironină G în 50 ml apă distilată și se agită, de asemenea, cu cloroform ; soluția capătă culoarea *roșie intens*. În momentul utilizării, se amestecă 7,5 ml soluție de verde de metil cu 12 ml soluție de pironină, la care se mai adaugă 30 ml apă distilată.

Tehnica de colorare :

1. Secțiunile deparafinate sau preparate totale din alge, fixate în alcool-acid acetic, se spală cu apă distilată ușor acidă ;

2. Se colorează, la temperatura camerei, timp de 5—6 minute ;

3. Se absoarbe excesul de lichid cu hîrtie de filtru ;

4. Se dehidratează și se diferențiază cu butanol terțiar, 5—6 minute ;

5. Preparatele se montează în rășini sintetice.

Efectul colorării. Organitele care conțin ADN se colorează în verde albastrui deschis, iar cele cu ARN în roșu deschis.

Recomandări. La identificarea ADN și ARN din structurile celulare. Soluția este eficientă la pH=4—5,5 ; culoarea soluției, roșie intens.

4.7. SUPRACOLORĂRI LA COLORAȚIA CU HEMATOXILINĂ

A. Supracolorarea citoplasmei

Substanțe necesare: eozină, acid acetic glacial.

Pregătirea soluției. Se dizolvă 1 g eozină în 100 ml apă distilată. Pentru întrebuințare curentă, soluția de bază se diluează cu apă distilată în proporție de 1 : 10.

Tehnica de colorare:

1. Preparatele se colorează în albastru ;
2. Se spală cu apă distilată și se colorează cu soluția de eozină diluată timp de 5—10 minute ;
3. Se spală cu apă distilată ; preparatele trebuie să apară supracolorate ;
4. După deshidratare în seria de alcool, se includ în rășini sintetice.

Efectul colorării. Constituenții celulari se colorează în roz pînă la roșu.

Recomandări. Colorația hematoxilină-eozină este cunoscută sub prescurtarea „H—E”. Dacă țesutul nu reține eozina (vezi punctul 3), se recomandă adăugarea unei picături de acid acetic glacial la 100 ml de soluție diluată.

Se recomandă o atenție deosebită în privința supracolorării (vezi punctul 4), deoarece soluția de eozină nu trebuie să acopere colorația anterioară cu hematoxilină. Contracolorarea cu eozină se recomandă mai ales în cercetările de embriologie. În lipsa eozinei, se pot utiliza : eritrozina, verde luminos, oranj G, fuchsină acidă ș.a. În toate cazurile se pregătește o soluție 1% în apă, iar pentru lucru o diluție, colorant-apă distilată de 1 : 10.

B. Supracolorarea pereților celulari lignificați

Substanțe necesare : safranină, alcool etilic 50% și 95%, formol 40%.

Pregătirea soluției. Se dizolvă 2 g de safranină în 100 ml alcool etilic 50%.

Tehnica de colorare :

1. Preparatele colorate în albastru cu hematoxilină (în afară de cele colorate cu hematoxilină ferică), se spală cu apă distilată ;

2. Se colorează cu soluție de safranină 1—24 ore sau chiar mai mult, în funcție de intensitatea culorii pereților lignificați ;

3. Preparatele se spală cu apă de robinet des schimbată ; structurile apar colorate în roșu omogen ;

4. Se face diferențierea preparatelor cu alcool etilic 95%, cu control la microscop. Diferențierea se oprește atunci când pereții lignificați, cromozomii și nucleolii, apar colorați în roșu, iar celelalte elemente celulare în albastru ;

5. După deshidratare în seria de alcool, se includ în rășini sintetice cu $\text{pH}=7$.

Efectul colorării. Pereții celulari lignificați, cromozomii mitotici, se colorează în roșu ; celelalte elemente celulare, în albastru.

Recomandări. Accelerarea colorării pereților lignificați se face cu adăugarea la soluție de safranină a citorva picături de formol 40% (vezi punctul 2). Safranina se va păstra în sticle cu dop rodat.

4.8. VARIANTE DE PREPARARE A REACTIVULUI SCHIFF

1. Se dizolvă 0,5 g fuchsină diamant în 80 ml apă clocotită. După răcire, soluția se filtrează, apoi se adaugă 20 ml HCl 1/N și 0,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Se lasă 24 ore,

în care timp soluția devine roșie-gălbuie, apoi se adaugă 0,5 g cărbune activ; se agită energic și se filtrează. Soluția este eficientă la $\text{pH}=2,5$. Acesta se realizează dizolvând 1—2 g NaOH în 100 ml soluție Schiff.

2. Se dizolvă în 100 ml apă distilată, clocotită, 1 g fuchsină bazică (cristale verzi, lucioase). După răcire, se filtrează și i se adaugă 20 ml HCl normal și 1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Se lasă 24 ore la întuneric la 18°C , timp în care devine gălbuie. Se decolorează cu cărbune activ (0,5 g cărbune activ), după care se filtrează.

3. Peste 1 g fuchsină bazică pudră se toarnă 200 ml apă distilată la 100°C . Se agită bine și se lasă să se răcească pînă la 50°C . Amestecul se filtrează, apoi se mai adaugă 30 ml HCl 1/N și 3 g pirosulfid de K. Se trece într-un flacon bine închis și se lasă 24 ore la întuneric. Culoarea soluției este gălbuie; pentru decolorare, se adaugă 0,5 g cărbune activ, după care se filtrează. Se va păstra la întuneric și la rece în sticle cu dop rodat.

Regenerarea reactivului Schiff. După un anumit timp de conservare, reactivul Schiff se înroșește și devine inutilizabil. Pentru a-l regenera, se adaugă 0,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ la 100 ml soluție Schiff colorată. După un anumit timp, soluția se decolorează și poate fi din nou utilizată.

Capitolul V

TEHNICI DE INVESTIGAȚIE A DIFERITELOR GRUPE DE PLANTE INFERIOARE

5.1. BACTERII

Aceste organisme se analizează de obicei pe frotiuri, dar și în secțiuni sau pe membrane filtrante. Vom da mai jos câteva modalități de a obține preparate proaspete sau durabile (frotiuri), necesare pentru a putea observa particularitățile morfologice ale diferitelor tipuri de bacterii.

Un frotiu se obține punând pe suprafața unei lame curate, o picătură din suspensia ce conține bacterii; ținem deasupra acesteia o altă lamă în unghi ascuțit în așa fel încât picătura să se afle în unghiul dintre lame; deplasând lama oblică, antrenăm și suspensia și astfel rezultă un frotiu subțire. Dacă se intenționează să se facă observații „in vivo”, atunci este mai bine ca frotiul să se prepare pe o lamelă.

Frotiurile pot fi analizate imediat la microscop, după efectuarea unei colorări vitale cu acridin oranj. În acest scop se pune peste frotiul bacterian o picătură de colorant (se evită uscarea frotiului), se lasă 5—10 minute, după care se înlătură excesul de soluție colorantă cu ajutorul hîrtiei de filtru și se aplică deasupra frotiului o lamelă. Nu este necesară spălarea. Astfel tratate, unele bacterii gram negative dau o fluorescență

verde și au membrana roșie clară, în timp ce alte bacterii sînt colorate în roșu uniform, ca și majoritatea bacteriilor gram pozitive.

Frotiurile bacteriene pot fi analizate și după fixare și colorare.

Fixarea se face de obicei prin acțiunea căldurii și numai în cazuri de excepție cu lichide, (de exemplu, cu amestecul alcool-acid acetic). Fixarea cu ajutorul căldurii a unui frotiu bacterian se face în felul următor: după uscarea la aer a frotiului se trece lama de cîteva ori pe deasupra flacării unui bec Bunsen, în așa fel încît, după această operație, temperatura lamei să poată fi suportată de dosul palmei. Prin încălzire, bacteriile sînt omorîte și în același timp se lipsesc de sticlă. Se evită supraîncălzirea lamei, pentru a nu duce la carbonizarea bacteriilor.

Frotiurile fixate prin căldură pot fi colorate imediat sau se pot păstra mai mult timp într-un loc ferit de praf.

Dacă frotiurile astfel făcute cuprind suspensii bacteriene ce conțin și grăsimi (de exemplu, cele din lapte acru etc.), este necesară degresarea lor înainte de colorare. Pentru aceasta se pun lamele într-un vas Laveran, care cuprinde cloroform sau eter. Se lasă aici 30—60 minute, în funcție de grosimea frotiului și de cantitatea de grăsimi conținută. Se scot lamele de la degresat și se lasă la aer, ca să se evapore solventul, după care se pot colora.

Colorarea frotiurilor bacteriene se poate face cu fuchsină fenicată, după Ziehl-Neelsen, violet de gențiană fenicată sau albastru de metilen, după Löffler, atunci cînd urmărim să ne informăm doar asupra aspectului morfologic general al bacteriilor. În felul acesta, obținem o colorare uniformă a întregului

corp al bacteriei, fără să apară diferențieri în interiorul celulei bacteriene. Astfel, albastrul de metilen, după L ö f f l e r, colorează foarte bine cocii ; fuchsina fenicată dă rezultate foarte bune asupra bacililor și spirililor ; în timp ce violetul de gențiana dă rezultate cam de aceeași valoare pentru toate tipurile morfologice de bacterii.

Indiferent de soluția de colorare folosită, se procedează astfel : se adaugă peste frotiul fixat cu ajutorul căldurii, câteva picături de soluție colorantă și se lasă 5 minute atunci când folosim fuchsina fenicată sau violetul de gențiană și 10—15 minute atunci când folosim albastrul de metilen, după L ö f f l e r. Se îndepărtează apoi colorantul și se spală frotiul cu apă de robinet pînă când acesta apare încolor. Lamele se așază în poziție verticală pe suporturi speciale. După uscare completă a preparatelor, acestea pot fi examinate direct la microscop, adăugîndu-se o picătură de ulei de cedru (ulei de imersie), fără lamelă. Pentru mărirea durabilității acestor frotiuri, se poate folosi o rășină sintetică și lamelă,

Colorări de frotiuri cu bacterii foarte clare se pot obține cu o soluție colorantă rezultată prin dizolvarea unui fragment de cca 1 cm în lungime, dintr-o mină de creion chimic, dizolvat într-un ml alcool de 95% denaturat. Se procedează la fel ca și în cazul utilizării celorlalți coloranți și astfel se obțin bacterii conturate foarte net, colorate în violet.

5.2. CIANOFICEELE

Cionoficeele sînt de dimensiuni reduse și destul de transparente pentru a putea fi analizate direct sub formă de preparate proaspete ; acestea pot fi menți-

nute mai mult timp dacă se înlocuiește apa evaporată. Astfel pot fi observate cianoficeele, dacă dorim să stabilim forma acestora, dimensiunile etc., date necesare efectuării determinării lor. Particularitățile structurale ale acestor organisme pot fi analizate adesea numai după fixarea și colorarea materialului.

Cianoficeele se fixează cu amestecul lui Pfeiffer, amestec în care pot fi conservate ani de zile și de aceea acest procedeu este recomandat pentru păstrarea materialului necesar la lucrările practice. Pentru a efectua apoi preparate permanente, se scoate materialul din fixator, se pune în soluție apoasă de glicerină 10%, trecându-l prin 3 băi, de câte 60 minute. În ultima baie, materialul este lăsat cca o săptămână, pentru a se îngroșa glicerina, după care se fac preparate fixe cu ajutorul gelatinei glicerinate. Materialele mai mari decât *Gloeocapsa*, *Oscillatoria* și altele, pot fi incluse în gelatină glicerinată, fără a aștepta îngroșarea gelatinei. Astfel, se pot alcătui colecții de preparate pentru a putea face studii comparative.

Colorarea cianoficeelor fixate se face, cu rezultate bune, cu alizarin-viridină+alaun de crom sau cu alizarin viridină+albastru de metilen. Materialul fixat cu amestecul lui Pfeiffer sau cu acid crom-acetic se pune 1—2 ore în amestecul colorant preparat proaspăt. După aceasta, se spală bine în apă de robinet și se include în gelatină glicerinată. Astfel tratat, materialul va prezenta plasma colorată în verde-albăstrui, unii constituenți celulari vor fi negri, iar tecile gelatinoase vor fi albastre.

Învelișurile mucilaginoase se colorează foarte bine cu „mucicarmin“, acest colorant se folosește pentru materialul colorat în prealabil cu alizarin-viridină, apoi spălat în apă de robinet și ținut 2—8 ore în soluție de

mucicarmin diluată. După această colorare se spală și se include în gelatină glicerinată. În preparatele astfel obținute, învelișurile mucilaginase ale cianoficeelor se colorează în roșu, iar plasma în verde. Tot astfel se va proceda și pentru colorarea învelișurilor mucilaginase ale altor alge.

Pentru punerea în evidență a cianoficinei, se introduc cianoficee vii în acid carmin-acetic fierbinte și astfel granulele de cianoficină se vor colora în roșu.

Pentru punerea în evidență a granulelor metacromatice se introduc cianoficee vii în albastru de metilen, după Löffler, în care se țin cca 15 minute; astfel granulele de metacromatină se vor colora în roșu-violet, în timp ce corpii centrali (centriolii) se vor colora în albastru.

Cromoplasma și centroplasma se pot pune mai bine în evidență pe material fixat, ținând materialul timp de 1 minut în acid cronic 10% în apă sau în amestecul crom-acetic. Apoi se spală și se colorează timp de 3 minute cu amestecul albastru de metilen+cozină, după care se spală din nou și se include în rășină sintetică. Materialul astfel pregătit va prezenta centroplasma albastră, în timp ce cromoplasma va fi roșie. Pentru diferențierea centro-și cromoplasmei se poate folosi și colorarea cu hematoxilină ferică Heidenhain, urmată de colorarea cu o soluție apoasă de eozi-nă. Și în acest mod se obțin rezultate bune, dar procedeul este de lungă durată.

Substanțele echivalente cu nucleul se pot pune în evidență prin colorarea Giemsa.

Glicogenul se poate pune în evidență cu soluțiile de iod (soluția Lugol sau cu tinctură de iod), obținându-se o colorație brună.

5.3. ORGANISME FLAGELATE

Organisme mobile, flagelatele se găsesc în diferite grupe de talofite ce nu sînt legate din punct de vedere filogenetic. Ele prezintă aceleași particularități ca și flagelatele în ceea ce privește efectuarea preparatelor microscopice, atît pentru observațiile „in vivo” cît și pentru obținerea unor preparate durabile.

Analiza flagelatelor vii se face cu ajutorul microscopului în cîmp luminos, iar pentru observarea mișcărilor flagelilor se folosește cîmpul întunecat, precum și contrastul de interferență în lumină transmisă.

Dacă în mediul natural din care se recoltează probele, flagelatele sînt în număr mic, este necesară centrifugarea probelor pentru mărirea densității acestora; pentru acest scop este suficientă o centrifugă acționată manual. Mărirea densității dinoflagelatelor se realizează cu ajutorul membranelor filtrante. Dar aceste organisme mai pot fi cercetate și în microculturi.

Pentru observarea în condiții bune a flagelatelor vii trebuie ca mediul în care sînt puse să contribuie la diminuarea mișcării. Astfel, peste picătura ce conține organismele flagelate de pe o lamă, se adaugă o soluție apoasă de gelatină 3%. Amestecul obținut, prin vîscozitatea lui, reduce mobilitatea organismelor. Pentru flagelatele coloniale de dimensiuni mari (*Volvox*, *Pandorina* etc.), se folosesc, pentru imobilizarea lor, lamele speciale prevăzute cu piciorușe.

Prezența plastidelor, de obicei mari, care maschează celelalte organite celulare, face imposibilă cercetarea citologică a flagelatelor pe material viu și de aceea este necesară fixarea și colorarea acestora.

Fixarea se face cu ajutorul unei soluții de iod atunci cînd urmărim să punem în evidență mai ales forma acestor organisme. Flagelii, precum și părțile parietale,

devin astfel brune și foarte vizibile. Rezultate mai bune la fixare se obțin prin folosirea amestecului lui Schaudinn. Se face un frotiu subțire din flagelatele concentrate pe o lamelă degresată în prealabil, care se scufundă apoi pentru câteva minute în soluția de fixator fierbinte. Fixatorul se spală în etanol 70%, efectuându-se câteva băi. Se controlează la microscop dacă preparatul prezintă părți de precipitat întunecate datorate mercurului din sublimat. Dacă acestea există, ele vor fi îndepărtate cu o soluție de iod (se amestecă etanol de 80% cu puțină soluție Lugol), amestec în care se pun lamelele cu materialul în jos, timp de 30 minute. Aceste băi se întrerup în momentul în care, controlând preparatele, materialul nu prezintă o colorație galbenă, deci pînă cînd este eliminat complet iodul.

Flagelatele mai pot fi fixate foarte bine și cu o soluție de acid crom-acetic slab sau cu amestecul lui Flemming. Dinoflagelatele se fixează cu amestecul lui Pfeiffer, în care pot fi ținute timp îndelungat.

Cele mai bune rezultate în efectuarea preparatelor de flagelate, în care se păstrează și culoarea cromatoforilor, se obțin cu amestecul de lactofenol cupric. Pentru efectuarea preparatului se pune pe o lamă o picătură din mediul care cuprinde cît mai multe flagelate, peste care se adaugă câteva picături din soluția de lactofenol cupric și se lasă 10—30 minute. După aceasta, se îndepărtează soluția fixatoare cu ajutorul unei hîrtii de filtru și apoi se efectuează un preparat durabil cu ajutorul gelatinei glicerinate. În acest mod se obține un preparat în care plastidele flagelatelor apar verzi albaştrui; de asemenea, apare clar și conturul celulelor, precum și flagelul. Colorarea materialului de flagelate se poate face fie în eprubeta de centrifugare, fie pe lamă, dacă materialul a fost bine prins cu ajutorul unui strat subțire de albumină ce se coagulează în procesul

de fixare. Se recomandă ca materialul fixat și spălat să nu fie colorat imediat, ci să se facă o deshidratare parțială, trecându-l prin seria de alcool 15% ; 35% ; 55% ; 70% și apoi efectuând deshidratarea succesivă, ceea ce va duce la obținerea unei colorații mai intense.

Pentru colorare se folosește hematoxilină Ehrlich, precum și hematoxilina Mayer. Colorarea cu hematoxilină dă rezultatele cele mai bune asupra materialului fixat cu amestecul lui Schaudinn.

La speciile coloniale de flagelate care necesită secționare, pentru a se putea face observații complete, este obligatorie metoda împarafinării. În acest scop, materialul este ținut în tuburi mici cu diametrul de 5 mm, închise la capăt cu tifon. Aceste tuburi sînt introduse pe rînd în soluția fixatoare, apoi în apă etc. Toate etapele în care se folosește parafina se desfășoară în termostat la 60°C. Cînd se ajunge la parafină curată se lasă 30 minute la temperatura camerei. După întărirea parafinei cu materialul inclus în ea, pentru a o putea scoate din tub, se scufundă tubul în apă adusă la temperatura de topire a parafinei, se îndepărtează tifonul și se împinge blocul de parafină din tubușor, cu ajutorul unui bețișor de lemn.

Pentru a putea localiza materialul biologic inclus, acesta se colorează ușor cu eozină, în momentul în care este trecut în băile de alcool absolut.

În vederea efectuării unor cercetări cariologice la flagelate se folosesc aceleași metode ca și la celelalte alge. Astfel, se fixează materialul într-un amestec de alcool-acid acetic (proportia acestora va trebui încercată pentru fiecare plantă). Se utilizează și alți fixatori ca : etanol pur, metanol pur, apa de iod și apa de brom, obținîndu-se rezultate foarte bune dacă se face o pre-fixare cu vapori de OsO_4 .

Fixarea se face în centrifuga de mână, apoi materialul se pune pe lamă și se colorează.

Punerea în evidență a flagelilor se face numai pe material viu, în contrast de fază. Pe materialul fixat, flagelii sînt bine conturați folosind soluția Löffler.

Plastidele pot fi analizate, de asemenea, foarte bine pe material viu, mai ales în lumină fluorescentă. Pentru a putea număra cloroplastele de la speciile de *Euglena*, se pune lama pe care se găsește o picătură de apă cu numeroase euglene deasupra unui vas cu cloroform. În acest mod, euglenele mor foarte repede, iar cloroplastele se contractă, putînd fi astfel ușor numărate.

5.4. ALGELE

Algele, îndeosebi cele filamentoase, constituie un material ce poate fi ușor examinat vital. Se fac preparate proaspete în apă, mediul lor natural de viață. Pe astfel de preparate se pot face observații îndelungate, cu condiția ca să se înlocuiască la timp apa evaporată din preparat. Algele se pretează, de asemenea, la colorări vitale, care sînt aceleași ca la plantele superioare. Cînd nu este posibilă efectuarea observațiilor vitale, algele de apă dulce, ca și cele marine, trebuie fixate, deci conservate.

Fixarea cu cele mai bune rezultate a algelor de apă dulce se face cu amestecul *Pfeiffer*, în care pot fi păstrate foarte mult timp, conservîndu-se chiar și culoarea verde a cromatoforilor.

Algele marine se fixează în formol diluat cu apă de mare în proporție de 1 : 10. În acest caz, timpul de fixare durează, în funcție de mărimea materialului, de la 1 oră pînă la 24 ore. După fixare, materialul se spală cu apă de mare de mai multe ori și apoi în

amestecuri de apă marină și apă dulce, în proporții diferite, de : 3 : 1, 1 : 1 și 1 : 3, după care se trece în apă dulce. La unele forme marine mai sensibile, fixarea în amestecul formol-apă de mare poate duce la contractarea materialului, încît pentru acestea se recomandă fixarea în amestecul formol-apă dulce și apoi se spală cu apă dulce. Formolul diluat cu apă de robinet poate constitui un bun fixator și pentru algele de apă dulce dacă în acest amestec se adaugă cîteva picături de acid acetic glacial.

Un alt fixator, folosit cu rezultate foarte bune atît pentru algele de apă dulce cît și pentru cele marine, este acidul crom-acetic diluat (cu apă de robinet pentru algele de apă dulce și cu apă marină pentru cele marine). Spălarea materialului se face cu apă de robinet pentru algele de apă dulce și cu apă de mare pentru algele marine.

Dacă urmărim să punem în evidență nucleul și citoplasma folosim ca fixator amestecul lui *Flemming*.

Colorația naturală a algelor poate fi menținută prin fixarea cu formol diluat, însă ele trebuie păstrate în borcane brune și ferite de intensități mari de lumină. Astfel tratate, primele alge care se vor decolora vor fi feoficeele, în timp ce cloroficeele și rodoficeele își păstrează mult timp culoarea. La cloroficee se poate face o colorație aproape naturală dacă se fixează materialul în lactofenol-cuprat și apoi se fac preparate din acest material, incluzîndu-l în gelatină glicerinată. Totuși, cu timpul, în preparatele durabile colorația naturală se pierde și de aceea este bine să se facă o colorare artificială a algelor, după fixare și spălare. Algele colorate nu se vor include în gelatină glicerinată, ci vor fi păstrate în glicerină diluată.

Colorarea algelor urmărește atît punerea în evidență a plastidelor cît și a altor organele celulare.

Pentru a colora în verde plastidele cloroficeelor se folosește amestecul alizarin-viridină + alaun de crom.

Pentru colorarea feoficeelor se folosește soluția Bismarck brun, care poate fi întrebuințată atât pentru materialul secționat cât și pentru preparate totale. Materialul fixat în formol diluat și spălat se introduce în colorant timp de 30 secunde pînă la 4—5 minute, verificînd la microscop, din cînd în cînd, intensitatea colorării, apoi se spală în alcool de 92% și se fac preparate durabile în rășini sintetice. Pereții celulari, precum și conținutul celular, vor căpăta diferite nuanțe de brun.

Rodoficeele tratate cu azocarmin B prezintă plastide cu o colorație care se apropie mult de cea naturală. Pentru obținerea acestei colorații se procedează în felul următor: se ia materialul care a fost conservat în formol diluat, se spală și se trece în apă dulce, apoi se mordansează timp de o oră în acid crom-acetic 1% în apă; se spală din nou și se trece în colorant, unde se lasă timp de două ore, după care se spală în apă de robinet. După deshidratare în seria de alcooli, se include în rășină sintetică. Se obține colorarea conținutului celular în diferite nuanțe de roșu, în timp ce pereții celulari rămîn necolorați.

Secționarea formelor parenchimatice de feoficee fixate în formol se poate efectua cu ajutorul briciului. Secțiunile obținute se montează în glicerină sau în gelatină glicerinată.

Se pot obține, de asemenea, secțiuni la microtom prin talul de la diferiți taxoni de feoficee, de exemplu *Laminaria*, incluzînd materialul respectiv în parafină. În desfășurarea diferitelor etape ale acestei metode se întîmpină greutăți mai ales în momentul etalării secțiunilor pe lamă, deoarece secțiunile tind să alunece,

încît în acest caz este bine să se aplice pe lame o peliculă de colodiu. Colorarea secțiunilor se face cu Bismark brun sau cu una din variantele de hematoxilină.

Modalități de efectuare a analizelor citologice la alge

Nucleul este adesea mascat de plastide, de aceea nu poate fi observat în stare vie. Pentru determinarea cloroficeelor îndeosebi, este adesea necesar să se stabilească numărul nucleelor. Dăm mai jos cîteva din procedeele de punere în evidență a nucleelor, care nu pot servi și pentru evidențierea cariochinezelor.

1. Se pun cîteva picături de apă de iod + eozină peste materialul de analizat, direct pe lamă, unde se lasă 15—30 minute (fără ca preparatul să se usuce). La început, cloroplastele devin brunii, în timp ce nucleul se colorează în roșu. La *Mougeotia*, pe lângă nucleu, se colorează și carioizii.

2. Se colorează materialul de analizat cu acid picric + albastru de anilină. Se poate efectua colorarea pe lamă sau, mai bine, într-o capsulă timp de 3—5 minute (sau mai mult, în funcție de specie). Se spală apoi bine materialul cu apă de robinet și se fac preparate în apă. Nucleele se vor colora albastru intens, punîndu-se în evidență mult mai bine decît cu apa de iod + eozină. În cazul acestor 2 colorări, culoarea variază de la o celulă la alta, efectul coloranților manifestîndu-se numai în unele celule.

3. Se pune peste materialul de pe lamă nigrozină și acid picric în cantitate mai mare decît volumul materialului. Se lasă 5 minute lama astfel pregătită în termostaț la 60°C. Materialul se analizează la microscop, punîndu-l într-o picătură de colorant. Nucleele și nucleolii apar închiși la culoare, pînă la negru, în timp ce plastidele devin gri-gălbui.

Pentru efectuarea *cercetărilor cromozomice* la alge se fac de obicei preparate totale. Algele se fixau în ames-

tecul Flemming sau în acid crom acetic și se colorau cu hematoxilină ferică. În cercetările citologice mai recente asupra algelor, materialul se fixează în amestecul alcool-acid acetic (proporția se determină pentru fiecare algă) și se colorează cu reactivul Feulgen sau amestecul carmin-acetic, în care materialul poate fi păstrat pînă la 1 an, precum și cu hematoxilină, după Wittmann.

Metoda de colorare cu hematoxilină, după Wittmann, a fost experimentată pe alge marine verzi, brune și roșii, precum și pe alge de apă dulce. Materialul se trece, fără spălare, direct din fixator în colorant pe o lamă, se adaugă lamela și se presează ușor. Dacă se obține o colorație prea slabă a cromozomilor, se încălzește preparatul ușor deasupra unei flăcări mici, pînă se produce o ușoară schimbare de culoare a soluției. Se trece apoi la analiza preparatului și cromozomii apar negri.

Metoda de colorare cu alaun de fier și acetocarmin dă rezultate bune pentru cromozomii de la majoritatea algelor. Ca fixator se folosește amestecul alcool + acid acetic. Se trece apoi materialul în soluție mordansantă de alaun de fier și potasiu, unde nu se lasă mai mult de 30 secunde, după care această soluție de mordansare este îndepărtată prin spălare cu apă de robinet schimbată de repetate ori în decurs de 5 minute. Se adaugă apoi peste material soluția de acetocarmin și se fierbe pe lamă. Timpul de colorare se stabilește pentru fiecare specie de algă în parte, prin verificarea preparatului la microscop. Preparatele pot fi analizate imediat sau se pot efectua preparate durabile. Cromozomii se colorează negricios pînă la brun, în timp ce citoplasma se colorează foarte slab.

Punerea în evidență a cromozomilor la algele brune parenchimatoase necesită preparate obținute prin strivirea materialului sau prin efectuarea de secțiuni. Pre-

paratele obținute prin strivire se pot colora cu acetocarmin sau reactivul Feulgen. Dacă se folosește colorația cu acetocarmin este necesar ca în prealabil să se obțină o înmuiere a țesuturilor.

Înmuierea se realizează cu ajutorul clorurei de litiu (LiCl), în felul următor: se prepară soluția A, din 4 g LiCl dizolvat în 100 ml apă distilată și soluția B, din acid carmin-acetic, la care se adaugă puțin acetat de fier.

Materialul se fixează în amestecul alcool + acid acetic, în care se lasă pînă se obține o decolorare completă și alga nu mai prezintă mucilagiu la atingere (în funcție de mărimea materialului se ține de la o oră la 12 ore). Se spală apoi în apă de robinet timp de trei, patru ore. După spălare, fragmentele de material se introduc în amestecul LiCl, unde se țin 15 minute, după care se pun în apă de robinet tot 15 minute. Materialul astfel pregătit se pune pe o lamă într-o picătură de apă de robinet, se acoperă cu lamela și se strivește ușor. Când materialul este suficient de etalat se pune pe marginea lamelei acid carmin acetic cu ajutorul unei pipete. După ce colorantul s-a repartizat uniform în preparat, acesta se încălzește cu grijă timp de trei minute, deasupra unei flăcări mici, pentru a se evita fierberea soluției. Înainte de a se examina preparatul, se presează ușor lamela. Preparatul poate fi analizat imediat sau poate fi păstrat o zi într-o cameră umedă după ce în prealabil a fost lutat cu parafină.

Pentru a putea folosi reactivul Feulgen la algele brune parenchimatice, se taie talurile în fragmente de cca 5 mm lungime și de 1—2 mm grosime și se fixează în amestecul lui Karpecienko, în care se țin 12—24 ore. Se spală apoi în apă de robinet timp de 3—4 ore, pentru a fi îndepărtată orice urmă de formol. După spălare, materialul se decolorează, ținîndu-l timp de

3—4 ore într-o soluție apoasă de 20% H_2O_2 , după care urmează din nou spălarea în apă curentă timp de 1 oră. Materialul astfel pregătit se încălzește în apă distilată la 60°C apoi se hidrolizează la aceeași temperatură în HCl 1 n, timp de 8—10 minute. Hidroliza se întrerupe prin scufundarea materialului în apă distilată, după care se trece apoi pentru 1 oră în apă + SO_2 proaspăt preparată. Se pune apoi pe o lamă o picătură de apă + SO_2 , se acoperă cu o lamelă, se strivește ușor. După aceea, se scoate lamela și se scufundă lamele într-un vas în care se găsește reactivul Schiff, unde se țin cca 6 ore. Se îndepărtează apoi reactivul prin efectuarea a 3 băi de apă + SO_2 , urmată de o bună spălare în mai multe băi de apă de robinet. După o deshidratare obținută prin trecerea materialului prin seria de alcool de diferite concentrații, se poate fixa în rășină sintetică.

Reacția Feulgen poate fi folosită cu rezultate bune și în cazul algelor filamentoase, dar este mai greu de stabilit durata exactă a hidrolizei. Pentru algele filamentoase ce urmează să sufere reacția Feulgen, cel mai bun fixator este amestecul Bouin.

Pentru a obține preparate cromozomiale la rodoficee se folosește ca fixator amestecul alcool-formol-acetic, care provoacă o contracție puternică a cromozomilor, permițând numărarea lor. Dacă fiind sensibilitatea algelor roșii, este indicat să fie colorate repede (reacția Feulgen) după fixare, pentru a se evita dezorganizarea talului.

Punerea în evidență a plastidelor majorității algelor nu necesită un tratament special, ele evidențiindu-se prin culoarea lor. Totuși cloroplastele se conturează mult mai bine dacă sînt observate la microscopul cu fluorescență (de exemplu plastidele reticuliforme de la *Hydrodictyon*).

Urmele de mucilagii lăsate de unele alge, prin deplăsarea lor, cum sînt, de exemplu desmidiaceele, sînt greu vizibile atît în contrastul de fază cît și în cîmp întunecat, ele devenind însă vizibile prin colorarea cu violet de gențiană. Pentru aceasta se lasă algele să se deplaseze cîtva timp pe lamă, apoi se înlocuiește apa cu soluția de colorant în care se lasă 10—15 minute; după aceea, se scurge colorantul și se spală lama în apă de robinet. După uscare la aer se include în rășină sintetică. Urmele mucilaginoase vor apărea colorate în violet pe fond deschis. Aceleași rezultate le obținem și dacă folosim drept colorant soluția amoniacală de roșu de ruteniu.

5.5. DIATOMEЕ

Acest grup de alge necesită metode și tehnici speciale de conservare și de efectuare a preparatelor microscopice, procedee determinate de ceea ce urmărim să observăm și anume: fie valvele silicioase, care prezintă o mare importanță în determinarea acestor organisme, fie conținutul celular.

Preparate din carapacele de diatomee se efectuează prin procedee speciale, deoarece valvele ce alcătuiesc carapacea acestora conțin un procent mare de silice, care are indicele de refracție aproape egal cu al majorității soluțiilor de rășini sintetice utilizate la includerea materialelor biologice colorate. De aceea trebuie folosite medii de includere cu un indice de refracție cu atît mai mare cu cît ornamentațiile valvelor sînt mai fine. La început trebuie distrus conținutul celular. Pentru aceasta se ia o probă de plancton care conține diatomee și se filtrează într-o pînză specială pentru îndepărtarea impurităților. Dacă proba nu este suficient de bogată în

diatomee se face concentrarea materialului în pahare conice. Se lasă un timp să sedimenteze, se agită vasul și din nou se lasă să se sedimenteze, această operație repetându-se pînă ce se obține un sediment bogat în diatomee. Se vor lua probe atît din sedimentul astfel obținut cît și de la suprafața apei (deoarece nu toate diatomeele cad la fundul paharului), verificînd la microscop prezența diatomeelor. Se poate ajunge la concentrarea materialului cu mult mai bune rezultate utilizînd o centrifugă de mînă.

Îndepărtarea conținutului celular se realizează prin mai multe procedee :

a) *Prin căldură.* Se ia o picătură din sedimentul cu diatomee și se pune pe o lamelă, întinzînd-o puțin. Se lasă să se usuce la temperatura camerei, se pune apoi lamela cu materialul în sus pe o tablă de cupru sau pe o plăcuță de mică și se încălzește la flacăra unui bec Bunsen pînă cînd materialul devine alb :

b) *Prin întrebuințarea oxidanților, fără utilizarea căldurii.* Aceștia pot fi folosiți direct în eprubetele centrifugii de mînă sau, cînd dispunem de mult material, în pahare Berzelius. Materialul se tratează cu acid sulfuric concentrat și se agită bine. Se adaugă apoi mici cantități de KMnO_4 și se amestecă din nou. Prin reacțiile chimice care au loc amestecul se încălzește și devine violet închis. Amestecul va fi decolorat prin adăugarea cîtorva ml dintr-o soluție apoasă concentrată de acid oxalic. Se agită din nou și se adaugă apă de robinet, după care se lasă să se sedimenteze. Apoi se decantează, se adaugă apă, se agită și din nou se lasă să se sedimenteze (această operație se repetă de cîteva ori).

c) *Printr-un procedeu combinat de oxidare și încălzire.* Se pune sedimentul bogat în diatomee într-un pahar Berzelius, peste care se adaugă acid sulfuric con-

centrat, care va depăși cu 2—3 cm nivelul sedimentului, apoi se fierbe timp de 20 minute pe o plită electrică sub nișe. Se obține o soluție înnegrită care va fi tratată cu puțin KNO_3 , pînă se produce o oarecare limpezire. Se lasă să se răcească și să se sedimenteze materialul. Se decantează, se pune apă de robinet, se agită și se lasă din nou să se sedimenteze. Se schimbă de mai multe ori apa, agitîndu-se de fiecare dată. Prin folosirea procedeului *b* și *c* de îndepărtare a conținutului celular se pot obține rezultate foarte bune, cu condiția să se utilizeze acid în exces.

După spălare se poate păstra mult timp materialul în alcool de 95% sau se pot efectua preparate permanente.

Dacă materialul ce urmează a fi cercetat nu prezintă structuri prea fine, se poate face *inclusiunea acestuia în aer*. Se pune un strat subțire din suspensia cu diatomee (în apă sau alcool) pe o lamelă și se lasă să se usuce parțial. Se confecționează din hîrtie, o ramă lată de 2—3 mm, cu laturile de lungimea laturilor lamelei; această ramă se lipește pe o lamă, cu ajutorul unei rășini sintetice și pe această ramă se lipește lamela cu materialul de diatomee îndreptat în jos.

Materialul de diatomee poate fi *inclus în Stirax*. Se pune pe o lamă o picătură din suspensia cu diatomee și se lasă să se usuce la temperatura camerei. Se adaugă apoi o picătură de Stirax și se aplică lamela. *Stiraxul* se întărește după cîteva luni.

Un mediu de includere foarte bun cu un indice de refracție destul de ridicat este și *pleurax-ul*, pe care-l putem prepara cu ușurință după rețeta lui V. Stosch: se topesc împreună, la 80°C, 100 g cristale de fenol și 40 g sulf și după ce această masă s-a răcit la 40°C, se adaugă 1,1 g sodiu metalic (în mici bucățele); se

fierbe timp de 5 ore la 180°C și se filtrează la 120°C ; în final la 3 părți filtrat se adaugă 5 părți fenol cristalizat.

Pentru a putea efectua observații asupra conținutului diatomeelor este necesar ca materialul să fie fixat și colorat. Ca fixatori sînt folosiți cu rezultate bune cei cunoscuți pentru alge, ca : acidul cromacetic, amestecul Pfeiffer, amestecul Flemming. Colorarea se face cu Bismark brun, hemalaun, alizarin-viridină și kernechtrot (roșu de nucleu), în funcție de ceea ce urmărim să punem în evidență.

Pentru urmărirea diviziunii kariokinetice la diatomee se folosesc ca fixatori : amestecurile alcool-acid acetic sau metanol-acid formic 3 : 1. După circa 2 ore de fixare într-unul din amestecurile amintite, pentru o mai bună punere în evidență a fusului nuclear, se trece materialul în următorul amestec : 100 ml metanol, 2,5 ml acid acetic glacial și 6 ml formol. Din acest amestec se trece în acid acetic 50%, care se schimbă de două—trei ori. Se colorează la temperatură camerei cu soluția carmin-acetic timp de 30 minute, după care se introduce pentru 15 minute într-un termostat la 80°C . Materialul se trece apoi într-o serie de soluții de fenol-acid acetic 50% în următoarele proporții : 1 : 3, 1 : 1 și 3 : 1, după care se include pe o lamă în fenol lichid.

5.6. CIUPERCILE

Ciupercile unicelulare cît și cele filamentose pluricelulare pot fi analizate cu multă ușurință „in vivo”. Aceste organisme pot fi, de exemplu, cultivate pe o lamă și observate din timp în timp; de asemenea, se pot efectua și culturi în picătură suspendată.

Pentru cercetarea structurii ciupercilor se folosesc diferite colorații vitale :

1. Se ia puțină drojdie și se amestecă cu o soluție de albastru de metilen în 500 ml apă de robinet. După 10 minute, celulele vii de drojdie se vor colora în albastru deschis, iar cele moarte, în albastru închis ;

2. Rezultate foarte bune se obțin la drojdii și la hife fungice prin colorarea cu acridin oranj. Materialul se pune într-o soluție de 0,1 g acridin oranj în 500 ml apă de robinet, în care sînt ținute cinci—zece minute. Hifele se iau cu penseta din colorant, se spală cu apă de robinet și se observă în apă. Aceste organisme, astfel tratate, vor prezenta plasma verzuie, nucleele verzi, vacuolele întunecate, în timp ce peretele celular va fi colorat în roșu.

Se pot efectua și preparate permanente, însă pentru aceasta este necesar ca în prealabil materialul să fie fixat. Pentru majoritatea ciupercilor cel mai bun fixator este amestecul Pfeiffer, dar se mai poate folosi și acid crom-acetic slab, precum și amestecul lui Flemming.

La ciuperci, obiectivul de studiu îl constituie, în primul rînd, fructificațiile, care se observă de obicei făcînd secțiuni cu briciul prin materialul proaspăt sau fixat. Pentru ciupercile ale căror fructificații prezintă lamele (himenofor lamelar), se vor face secțiuni paralele cu acestea, iar pentru cele care au tubuli, (himenofor tubular), secțiunile se vor face perpendicular pe tubuli. Secțiunile astfel obținute se includ de obicei în gelatină glicerinată fără o colorare prealabilă.

Colorarea secțiunilor de mîna se face cu bune rezultate numai pe material fixat. Se folosesc de obicei soluțiile de hematoxilină, la care mordantul și colorantul se găsesc în aceeași soluție. Se mai poate folosi alaun de crom-alizarin viridină sau roșu de nucleu. Secțiunile colorate cu hematoxilină se includ în rășini

sintetice, după ce au fost deshidratate în seria de alcool, iar cele care au fost colorate cu ceilalți coloranți citați, se includ în gelatină glicerinată.

Secțiunile la microtom se pot efectua prin material inclus în parafină sau în celoidină. Includerea în parafină prezintă inconvenientul că citoplasma se contractă la căldură, totuși se obțin secțiuni bune prin carpofozii multor „ciuperci cu pălărie”. Cele mai bune secțiuni se obțin totuși din materialul inclus în celoidină.

Colorarea secțiunilor făcute cu microtomul se face cu hematoxilină ferică (după Heidenhain).

Kariokineza la ciuperci poate fi observată foarte bine pe material viu la microscopul cu contrast de fază. Pentru fixarea materialului se folosește amestecul alcool-acid acetic, iar colorarea se face cu soluția Giemsa.

Nucleele și cromozomii la fungi pot fi puși în evidență și prin metoda *Feulgen*. Folosind această reacție, se pot contrasta foarte bine nucleee și cromozomi, fiind însă necesar un microscop cu fluorescență, care permite excitarea fluorescenței cu lumină verde incidentă. Pentru aceasta se procedează în felul următor: se taie miceliul în fragmente de 1—2 mm și se fixează în alcool-acid acetic 3:1 timp de 4 minute; se face apoi hidroliza în HCl 5n., la temperatura camerei, timp de 5 minute; se spală cu apă timp de 1 minut și se colorează apoi cu reactivul Schiff 10 minute; se spală în 3—4 băi de apă cu SO₂, se strivește apoi pe lamă în acid acetic 45%, după care urmează deshidratarea și includerea în rășină sintetică. La microscopul cu fluorescență, nucleele și cromozomii apar la excitarea cu lumină verde, în fluorescență roșie. De asemenea, se poate pune în evidență traseul hifelor, combinând

fluorescența în lumină incidentă cu contrastul de fază în lumină transmisă.

Identificarea ciupercilor parazite în diferite țesuturi ale plantelor superioare, pe care le parazitează, se poate face atât pe secțiuni făcute cu briciul cât și pe secțiuni efectuate cu microtomul în material inclus în parafină sau celoidină, precum și în preparate totale.

Pentru a efectua preparate totale în care să se poată urmări traseul hifelor în țesuturile plantelor superioare, materialul se fixează în amestecul AFE (alcool-formol-acetic), amestec în care poate fi și conservat pentru mai mult timp. Din fixator, materialul este trecut în alcool de 70%, timp de 1—2 zile pentru decolorare (procesul poate fi accelerat prin punerea materialului în termostrat la 50°C). Se trece apoi materialul în lactofenol, unde se lasă pînă devine complet translucid, cu excepția celulelor care au pereții celulari lignificați; acest proces poate dura o zi sau chiar mai mult, dar poate fi accelerat — dacă materialul este suficient de rezistent — prin fierbere timp de 10 minute. Se scoate apoi materialul din lactofenol, se pune în soluția de albastru de anilină + lactofenol, se fierbe cîteva secunde și apoi se lasă încă 2 minute în soluția fierbinte. Materialul albăstrit se trece din nou în lactofenol pur, se fierbe cîteva secunde, lăsîndu-se 1—2 minute în această soluție fierbinte. Materialul astfel pregătit se pune pe lamă în lactofenol, iar preparatul devine durabil dacă lamela este etanșată cu o rășină sintetică. Materialul va prezenta țesuturile plantei gazdă incolore, în timp ce plasma hifelor ciupercii parazite va fi mai mult sau mai puțin intens colorată în albastru; de asemenea, se vor putea distinge și nucleele hifelor ce vor fi mai accentuat colorate în albastru.

Dacă se fac secțiuni prin organele plantelor superioare atacate de ciuperci, materialul va fi fixat tot în amestecul AFE și prin materialul astfel fixat se pot obține secțiuni cu briciul (de mână) sau cu microtomul.

Secțiunile efectuate cu briciul se clarifică și se colorează la fel cum s-a procedat pentru obținerea preparatelor totale.

Secțiunile la microtom se fac prin material inclus în parafină atunci când urmărim să stabilim traseul exact al hifelor în țesuturile plantei gazdă sau prin materialul inclus în celoidină, atunci când intenționăm să facem studii cariologice.

Colorarea secțiunilor făcute la microtom, pentru a pune în evidență hifele, vor fi colorate folosind: safranină, violet de gențiană, verde de lumină sau colorația Pianese.

Colorația Pianese este o colorație des folosită, îndeosebi pentru secțiunile obținute prin materiale împarafinate. După deparafinare, secțiunile se trec în apă distilată și se colorează timp de 45 minute, apoi se scurge colorantul de pe lamă și se spală repede cu puțin alcool de 95%. Diferențierea se face timp de 1 minut, într-un amestec alcătuit din 99 ml alcool 95% și 1 ml acid acetic glacial; după aceasta se face deshidratarea în alcool izopropilic absolut și se include în rășini sintetice.

Secțiunile astfel pregătite vor prezenta țesuturile plantei gazde colorate în verde, iar miceliul va fi colorat în roz strălucitor.

Pentru punerea în evidență a hifelor fungice din lemn se fac secțiuni cu briciul prin material proaspăt sau cu microtomul prin material inclus în parafină, secțiuni ce se colorează timp de 5 minute cu soluție de safranină, după care se spală cu apă de robinet;

apoi se acoperă cu soluție de albastru de anilină și se încălzește la o flacără mică pînă la fierbere; se scurge colorantul și după răcirea lamei se spală cu apă de robinet; urmează apoi clarificarea în alcool etilic 70% și deshidratarea în alcool izopropilic absolut, iar după aceea se include în rășină sintetică.

În preparatele astfel obținute, lemnul apare colorat în roșu, în timp ce miceliul ciupercii apare colorat în albastru. Zonele de țesut lemnos puternic atacate apar albastre, iar hifele sînt colorate în albastru intens, evidențiindu-se astfel pregnant.

5.7. LICHENII

Lichenii trăiesc în cele mai variate condiții de mediu, constituind un material de studiu foarte accesibil. Lichenii mai prezintă avantajul că pot fi păstrați timp îndelungat în stare uscată, fără să apară artefacte. Înainte de a se trece la efectuarea preparatelor microscopice, materialul trebuie ținut înainte de secționare timp de cîteva ore în apă de robinet.

Dacă talul cît și fructificațiile sînt destul de mari se pot face numai secțiuni cu briciul (de mînă), iar pentru aceasta materialul nu trebuie fixat în nici un amestec fixator. Se fac secțiuni cît mai fine și se includ în glicerină diluată sau în gelatină glicerinată, obținînd astfel preparate durabile. Dacă totuși secțiunile nu sînt suficient de subțiri, se poate apăsa lama pentru disocierea țesuturilor.

Pentru a putea efectua secțiuni la microtom este necesar ca materialul să fie fixat, iar cei mai folosiți fixatori pentru licheni sînt: amestecul lui Pfeiffer, formolul diluat și acidul crom-acetic. Ca mediu de includere se folosește parafina, cu bune rezultate pen-

tru puține specii de licheni (de exemplu speciile genului *Baeomyces*). Majoritatea lichenilor supuși acestei metode devin casanți și aproape imposibil de secționat. De aceea se recomandă includerea în celoidină, metodă prin care se obțin rezultate mai bune cu numeroase specii de licheni. Cele mai bune rezultate se realizează însă prin includerea talurilor și fructificațiilor lichenilor în gelatină și secționarea lor cu ajutorul microtomului congelator.

La colorarea secțiunilor prin licheni obținute cu briciul sau la microtom se întâmpină unele dificultăți. Preparatele proaspete pot fi colorate cu soluție de clorură de zinc iodată, care colorează pereții celulari celulozici ai algelor în albastrui, în timp ce pereții chitinoși ai ciupercii se colorează brunii. Se mai pot obține colorări, pentru preparatele durabile, cu azocarmin. Se procedează la fel ca la colorarea algelor roșii. Rezultate bune se pot obține și prin colorări cu hematoxină ferică.

Secțiuni prin lichenii endolitici se pot obține numai prin șlefuire.

Capitolul VI

TEHNICI CITO-HISTO-EMBRIOLOGICE

Cercetările de microscopie în domeniul biologiei vegetale efectuate în țara noastră s-au axat mai ales pe studiul celulei și al țesuturilor; abia în ultimile două decenii s-au amplificat și cercetările embriologice.

Cunoașterea structurii celulei și a țesuturilor vegetale, a modificării acestora sub influența condițiilor de mediu, a necesitat adaptarea permanentă a tehnicii clasice de laborator, a realizării de amestecuri fixatoare și de noi combinații de coloranți.

În cele ce urmează, prezentăm câteva tehnici de efectuare a preparatelor pentru cercetări citologice, histologice și embriologice.

6.1. TEHNICI CITOLOGICE

Dintre organele celulare, cel mai investigat a fost și este nucleul, el fiind implicat în procesul de cariokineză.

6.1.1. EXAMINAREA „IN VIVO” A NUCLEULUI

De cele mai multe ori, nucleul celular este greu de observat în câmp luminos din cauza slabului său contrast față de citoplasmă. Nici cercetarea lui în câmp

întunecat nu conduce întotdeauna la rezultate satisfăcătoare. Cea mai indicată tehnică în cercetările de acest fel este cea a contrastului de fază, cu condiția ca materialul (secțiunile) să fie suficient de subțire.

Se pretează pentru cercetarea nucleului in vivo, perii staminali de la *Tradescantia*, nucleul generativ din tubul polinic (atunci când diviziunea nu a avut loc în granula de polen ș.a.).

1. Pentru punerea în evidență a membranei nucleului viu se folosesc soluții colorante vitale cu fluorocrome lipidosolubile. Soluțiile diacrome (albastru de metilen ș.a.) colorează numai nucleele nevii.

Dintre fluorocrome recomandăm: rodamina B și tetraciclina.

2. Evidențierea *cromatinei* se face cu acridin oranj. Pentru fluorocromarea vitală se dizolvă 0,1 g în 1000 ml apă de robinet cu $\text{pH} = 7$. După 10—15 minute de colorare se spală cu apă de robinet cu $\text{pH} = 7$; cromatina și nucleolii prezintă fluorescență verde în lumina albastră, cariolimfa rămâne incoloră.

3. *Cariolimfa* se colorează vital cu fluorocrome acide de tipul fluoresceinatului de K: se dizolvă 0,1 g colorant în 1000 ml apă de robinet cu $\text{pH} = 7$. După 10 minute de colorare, se spală cu apă de robinet cu $\text{pH} = 7$. Nucleele vii și citoplasma dau fluorescență verde omogenă în lumină albastră; contrastul între cele două componente ale celulei demonstrează moartea nucleului.

6.1.2. EXAMINAREA NUCLEULUI PE MATERIAL FIXAT

De cele mai multe ori, cercetarea nucleului se face pe secțiuni microtomice sau frotiuri fixate și colorate în prealabil.

Secțiuni microtomice. Cercetarea nucleului, pe secțiuni microtomice, în vederea alcătuirii cariogramelor, are avantaje și dezavantaje. Dintre avantaje menționăm :

- se folosește o cantitate mică de material din care se poate scoate un număr mare de secțiuni seriate ;
- se poate urmări procesul, mitotic sau meiotic, în faze succesive naturale ;
- se poate prelucra orice fel de material biologic, indiferent de mărimea și consistența lui.

Unele dezavantaje pe care le are acest mod de investigație au făcut pe mulți cercetători să părăsească această tehnică în favoarea celei prin etalare. Dintre dezavantaje cităm pericolul de a tăia părți din plăcile metafazice sau din cromozomi, ceea ce ar conduce la configurații greșite ale cariogramelor. Dacă acest inconvenient poate fi depășit prin cercetarea unui număr mare de celule, rămîne cel de al doilea care se referă la cantitatea mare de timp solicitată de tehnica secționării la microtom comparativ cu cea a etalării prin strivire.

Modul concret de obținere a preparatelor prin secțiuni microtomice a fost prezentat mai înainte.

Tatonarea materialului în vederea secționării la microtom este de mare importanță, mai ales cînd urmărim cariokineza. Dacă materialul respectiv nu conține faze ale diviziunii nucleului nu se mai împarafinează.

Preparatele preliminare, de tatonare, se execută după tehnica etalării sub lamelă, fixînd și colorînd în același timp cu verde de metil și acid acetic, astfel : Se dizolvă 1 g verde de metil în 100 ml apă distilată. Pentru purificarea soluției de verde de metil se adaugă cloroform și se agită într-o pîlnie de separare pîna

cînd cloroformul rămîne incolor. Din această soluție curată se scot 50 ml și se amestecă în tot atîția de acid acetic glacial.

Se sectionează transversal anterele, cu ajutorul unei lame de ras, se scoate țesutul sporogen și se întinde pe lamă, apoi se acoperă cu o picătură de verde de metil și acid acetic glacial. Materialul se acoperă cu lamela și se analizează la microscop. Nucleele și cromozomii, în lumină roșie apar colorați în verde deschis. Pentru analize orientative în vîrfurile vegetative meristematie se poate înlocui verdele de metil acetic cu acid carmin-acetic.

Fixarea materialului trebuie să aibă în vedere scopul cercetării. O fixare bună atît a nucleului cît și a citoplasmei se realizează cu soluția *Flemming*; dacă piesele de sectionat sînt mici și neconsistente, soluția fixatoare cu OsO_4 dă rezultate foarte bune; dacă plasmolize incipiente ale citoplasmei sau mici aglomerări ale acestora nu ne deranjează, se pot utiliza cu bune rezultate soluții cu acid cromacetic, alcool-acetic (alcool propionic) sau fixatorul Navașin.

Pentru fixarea anafazei și telofazei mitotice se obțin rezultate bune cu fixatorul *Bouin*, iar cînd secțiunile urmează a fi colorate cu hematoxilină ferică, cu amestecul *Bouin-Allen*.

Includerea țesuturilor se face în parafină, iar colorarea cromozomilor, în secțiuni microtomică care nu depășesc 15 μm cu hematoxilină ferică, după *Heidenhain*. Foarte bune rezultate se obțin cu soluții de hematoxilină la care colorantul și mordantul se găsesc în aceeași soluție, uneori urmate de o supra-colorare cu safranină.

Rezultate excelente se obțin cu violetul de gențiană, dar și reacția Feulgen colorează cromozomii tot așa de bine în secțiunile microtomică cu condiția ca timpul

de fixare și hidroliză să fie bine stabilite. O contras-tare bună se realizează examinând la microscop în lumină verde, secțiunile colorate.

Colorațiile multiple ale secțiunilor microtomice au avantajul că atât cromozomii, fusul mitotic și frag-moplastul, sînt colorate distinct. Dintre colorațiile mul-tiple se recomandă în ordine: hematoxilina și safra-nina, safranina și Lichtgrün, safranină-cristal violet-Lichtgrün, după o fixare cu acid cromic sau Bouin.

6.1.3. ETALAREA PRIN STRIVIRE A MATERIALULUI VEGETAL

Cercetările cariologice din zilele noastre se fac în primul rînd pe material etalat sub lamelă. Celulele rezultate prin etalare, păstrează în întregime setul caracteristic de cromozomi, deși fusul mitotic se dezor-ganizează.

Etalînd materialul prin strivire putem obține atât preparate proaspete cît și permanente.

Prepararea frotiurilor se realizează întotdeauna fo-losind material proaspăt. Acesta este mai întîi macerat într-o soluție cu reacție acidă, iar după colorare se eta-lează, într-un strat unicelular între lamă și lamelă.

În marea majoritate a cazurilor, macerarea și colo-rarea se fac în aceeași soluție. Numai cînd materialul vegetal este mai compact sau mai consistent, mace-rarea și colorarea se fac cu soluții separate. În asemenea cazuri, fixatorul cel mai indicat este cel bazat pe al-cool-acid acetic (alcoolul acido-propionic). Amestecu-rile cu acid cromic sînt inutilizabile la etalarea prin strivire a materialului vegetal.

Colorarea cromozomilor etalați prin strivire se face cu acetocarmin, după o fixare cu alcool-acid acetic cu orceină-acid-acetic sau cu albastru de rezorcină-acid acetic.

Colorația Feulgen poate fi folosită cu succes la confecționarea preparatelor prin etalare între lamă și lamelă. Mai întâi se fixează cu alcool-acid acetic, se hidrolizează, apoi se colorează cu reactivul Schiff și se spală cu apă și SO_2 . După aceste operații, materialul se etalează prin strivire.

Macerarea materialului în vederea etalării sub lamelă este o operație extrem de importantă. Dacă aceasta nu s-a realizat complet prin efectul carminului, orceinei sau rezorcinei acetice, se procedează la o macerare cu HCl 1 normal.

Din amestecul fixator, materialul se trece în apă de robinet și apoi în HCl 1 normal, pentru 15—30 minute.

Argintarea cromozomilor. Obținerea unui contrast foarte bun se realizează cu ajutorul unei soluții de AgNO_3 astfel :

1. vîrfurile vegetative meristematice se fixează 1 oră în acid acetic 50% ;
2. se spală bine cu apă distilată, cu schimbarea apei de cîteva ori ;
3. se tratează cu o soluție apoasă 2% de AgNO_3 la 70°C, la întuneric, 12—15 ore ;
4. se spală bine cu apă distilată 30 minute, cu schimbarea apei de cîteva ori ;
5. se tratează vîrfurile vegetative cu o soluție din părți egale de formol 10% și hidrochinonă 1%, timp de 1—2 ore ;
6. se așază pe o lamă într-o picătură de acid acetic 50% și se etalează prin strivire.

În lumină verde, cromozomii apar colorați brun.

Demonstrarea rapidă a cromozomilor. Pentru demonstrații rapide sau tatonări ale diviziunii nucleului se procedează astfel :

1. se fixează vîrfurile meristematice în alcool și acid acetic 3 : 1, apoi se fierb 1—3 minute în acid acetic 50%, într-o eprubetă mică ;

2. se așază pe lamă într-o picătură de acid acetic 50% și se etalează prin strivire.

După răcirea materialului, se examinează la microscop în contrast de fază.

Efectuarea preparatelor permanente din materiale etalate prin strivire. Sub această formă se conservă foarte bine materialele vegetale colorate cu carmin-acetic,orceină acetică, rezorcină acetică și alaun de crom-hematoxină. Se procedează în felul următor :

1. se unge cu albumină lama (lamela) sau amîndouă ;

2. se trece scurt timp printr-o flacără mică pentru coagularea albuminei pe lamă, în vederea asigurării unei aderențe bune a materialului ;

3. se așază materialul colorat pe lamă astfel pregătită și se etalează sub lamelă ;

4. se așază lama într-un vas Petri cu alcool 90%, pînă cînd lamela se desprinde de pe lamă ;

5. se pune o picătură de euparal și se rează lamela.

Contractarea cromozomilor. Pentru a fi mai ușor analizați și pentru o mai mare siguranță în aprecierea numărului, cromozomii se contractă cu soluție apoasă de colchicină astfel :

1. se dizolvă 0,01 g colchicină în 100 ml apă pentru vîrfurile meristematice radiculare sau alte materiale vegetale care se cercetează cariologic ; soluția trebuie să fie proaspătă ;

2. se lasă în contact două ore ;

3. materialul se fixează în alcool-acid acetic, se așază pe lamă și se etalează prin strivire.

Colchicina fiind și citostatic, oprește mitoză în metafază, ușurînd în acest fel alcătuirea cariogramelor.

6.1.4. EXAMINAREA „IN VIVO” A CLOROPLASTELOR

Cloroplastele se pot ușor examina în secțiuni subțiri sau în fragmente de frunze subțiri (*Elodea canadensis* ș.a.). Materialul se așază pe lamă într-o picătură de apă, se așază lamela și se analizează la microscop în câmp luminos.

La microscopul cu fluorescență, în lumină albastră, contrastul crește, iar în cloroplaste se poate urmări dispoziția granelor.

În acest caz, materialul viu va fi cercetat într-o picătură de diclorfenil dimetiluree (DCMU).

Coloranți vitali ai cloroplastelor. Cu toate că examinarea cloroplastelor „in vivo” se poate face și fără o colorație prealabilă, rezultate superioare se obțin după o colorație cu rodamină B.

Cercetarea materialului vegetal fixat. Materialul vegetal verde se conservă foarte bine după o fixare cu acid cromacetic. Un astfel de material, înainte de a fi examinat la microscop, va trebui contrastat cu alaun de crom-alizarinviridină, cu hematoxilina-eozină sau cu safranină-violet de gențiana-Lichtgrün, în felul următor :

1. fragmentele de frunză verde (cu cloroplaste încă vii) se introduc într-o soluție apoasă 1% de AgNO_3 și se lasă la lumina solară 5—10 minute ;

2. se spală cu apă ;

3. tratarea cu hidrochinonă 3%, timp de 5—15 minute ;

4. se spală în apă și se examinează imediat într-o picătură de apă sau după deshidratare se include într-o rășină sintetică.

La microscop, cloroplastele și pereții celulari apar colorați în brun până la negru.

6.1.5. EXAMINAREA MITOCONDRIILOR

Cercetarea mitocondriilor „in vivo” este dificilă și nesatisfăcătoare din cauza contrastului slab, realizat în câmp luminos la microscop.

Cele mai bune rezultate se obțin pe material fixat în amestecul Regaud (80 ml soluție apoasă, 3% de $K_2Cr_2O_7$ + 20 ml formol 3%), împarafinat, secționat și colorat apoi cu hematoxilină ferică.

Preparate obținute prin etalare. Pregătirea preparatelor pentru cercetarea mitocondriilor fără fixare și colorare solicită foarte mult timp. Mult mai repede se pot obține preparate după tehnica etalării sub lamelă :

1. vîrfurile meristematice radiculare se introduc într-o soluție clorhidrată de orceină în acid tricloracetic (1% orceină în acid tricloracetic 20% : 1 ml din această soluție se tratează cu 0,1 ml HCl normal înainte de întrebuințare) ;

2. timpul de colorare al mitocondriilor este cuprins între 2 și 24 ore ;

3. materialul astfel colorat se așază pe lamă într-o picătură de colorant și se etalează sub lamelă.

Mitocondriile se colorează în roșu uniform, iar proplastidele apar roșii deschis, limitate de o margine roșie închis. Nucleele și cromozomii se colorează de asemenea în roșu.

Preparatele astfel obținute se vor analiza în lumină verde.

Pentru efectuarea preparatelor permanente, materialul etalat se va monta în *fitohistol*.

6.1.6. EXAMINAREA MEMBRANELOR PLASMATICE

Membranele plasmatice ale celulelor vegetale devin clar vizibile prin fluorocromare cu tetraciclină :

1. se detașează un fragment epidermal de pe frunzele cărnoase ale unui bulb de ceapă și se introduce într-o soluție de 50 mg tetraciclină în 50 ml apă de robinet, pentru 5—10 minute ;

2. se montează într-o picătură de apă pe lamă și se examinează la microscopul cu fluorescență.

Membranele plasmatiche, membranele nucleare ale mitocondriilor, proplastidelor și dictiozomilor apar aurii ; firișoarele citoplasmatiche, interpretate ca endomembrane, apar la fel colorate.

6.1.7. EXAMINAREA SFEROZOMILOR

Identificarea sferozomilor în materialul viu este posibilă după o fluorocromare vitală ;

1. materialul viu se colorează 10 minute cu o soluție de 0,01 g sulfat de albastru de nil la 100 ml apă de robinet ;

2. se spală repede ;

3. se analizează într-o picătură de apă, în lumină albastră. Sferozomii prezintă o fluorescență galben deschisă.

Sferozomii pot fi cercetați pe material viu, în câmp luminos sau în contrast de fază. Ei apar ca puncte foarte lucitoare.

6.1.8. EXAMINAREA VACUOLELOR

Cele mai bune rezultate se obțin pe material viu, astfel :

1. se detașează un fragment din epidermă (ceapă, Rheodiscolor ș. a.) și se efectuează un preparat proaspăt ;

2. dacă vacuola este incoloră se colorează cu roșu neutru (0,1 g roșu neutru la 100 ml apă de robinet) ;

3. se colorează 10—15 minute, apoi se spală cu apă de robinet și se examinează imediat.

Vacuolele și pereții celulari se colorează în roșu.

6.1.9. EXAMINAREA UNOR SUBSTANȚE ERGASTICE

Substanțele ergastice sînt produse ale metabolismului celular. Dintre acestea, se pot pune în evidență la microscop următoarele :

1. *Grăsimile*, care se pot identifica pe secțiuni proaspete sau fixate în formol. Secțiunile de mîină sau microtomice se colorează cu Sudan III sau IV și se montează în gelatină glicerinată.

2. *Amidonul* de rezervă se poate identifica, pe secțiuni de mîină sau microtomice, folosind soluția Lugol sau tinctura de iod. Amidonul din cloroplaste poate fi pus în evidență cu soluția de *cloral iodat* (5 g cloralhidrat, în 2 ml apă + iod pînă la saturație), preparat înainte de folosire.

În contact cu aceste soluții, amidonul se colorează în albastru.

3. *Aleurona* (substanțe proteice) din semințele de ricin, de exemplu, se pune în evidență tratînd o secțiune din endosperm cu o picătură de acid azotic concentrat. Substanțele proteice se colorează în galben. Dacă se aspiră pe sub lamelă o picătură de amoniac, galbenul trece în portocaliu.

6.2. TEHNICI HISTOLOGICE

Cormofitele, fiind plantele cele mai evolute, prezintă țesuturi veritabile adaptate la cele mai variate condiții de mediu.

Studiul histologic al organelor cormofitelor se face în majoritatea cazurilor pe secțiuni, obținute din material proaspăt sau conservat. Mediul de fixare a materialului vegetal variază în funcție de componentele citohistologice care urmează a fi analizate în preparatul efectuat.

6.2.1. FIXAREA MATERIALULUI VEGETAL FĂRĂ CONSERVAREA CONSTITUENȚILOR CELULARI

Cînd se urmărește numai analiza pereților celulari dintr-un preparat, materialul de studiu se fixează cu alcool etilic (etanol) de 95% sau în alcool medicinal, în care poate fi păstrat mai mult timp. Dacă obiectele au devenit însă prea fragile în urma conservării îndelungate, ele se pot înmuia punîndu-le cîteva minute în apă de robinet.

Prin fixarea în alcool, unele obiecte, de exemplu *Monotropa*, se înnegresc. Dacă aceasta constituie un impediment în cercetarea obiectelor fixate, ele se trec pentru cîteva ore, după fixare, în apă cu SO_2 , pînă se decolorează.

6.2.2. FIXAREA MATERIALULUI VEGETAL CU MENȚINEREA CONSTITUENȚILOR CELULARI

În vederea realizării acestui scop, materialul necesar studiului anatomic se fixează în primul rînd cu amestecul fixator alcool-formol-acid acetic glacial (AFE). Pentru a evita oprirea plasmolizelor intense, precum și a altor artefacte, se experimentează mai întîi procentul optim al celor trei componente ale amestecului fixator.

În afară de acest tip de amestec fixator (AFE), s-au folosit încă de multă vreme, pentru fixarea materialului

anatomic, acizii crom-acetici. S-a constatat însă, că în multe cazuri, aceștia fixează mai bine conținutul celular, iar mitozele se conservă foarte bine. Utilizarea acizilor crom-acetici este însă mai complicată decât a amestecului AFE, astfel că pentru scopuri didactice nu se recomandă folosirea acestora ca fixatori.

Prelucrarea materialului fixat. Materialul necesar cercetărilor fitoanatomice se pretează foarte bine la efectuarea secțiunilor cu briciul (secțiuni de mînă), în unele cazuri acestea redînd imagini mult mai clare decât secțiunile făcute la microtom.

Secționarea diferitelor obiecte vegetale în vederea studiului lor histologic se poate face direct cu microtomul, fără a fi necesară includerea materialului în vreun mediu. Pentru aceasta se folosește un microtom cu sanie la care briciul (cușitul) ascuțit adecvat, se așază foarte înclinat. În modul acesta se secționează majoritatea obiectelor lemnoase proaspete, obținîndu-se astfel secțiuni mult mai bune decât cele incluse.

În unele cercetări anatomice (de exemplu, la urmărirea traseului fasciculelor conducătoare, a originii și structurii gineceului, a ovulelor ș.a.), sînt necesare secțiuni succesive care se obțin prin includerea obiectelor respective în parafină și secționarea lor la microtom.

Uneori secționarea în parafină este dificilă, mai ales în cazul materialului lignificat, care se rupe ușor, dar această dificultate se poate înlătura, reducînd cît mai mult durata etapelor de preparare a materialului pentru împarafinare, de exemplu trecerea prin seria de alcool, prin mediul intermediar, în parafină topită, evitîndu-se totodată acțiunea puternică a alcoolului absolut, adică deshidratarea totală a țesuturilor. Evitarea ruperii și spargerii obiectelor incluse se mai poate obține și prin

tratarea blocurilor de parafină, care au început să fie secționate, cu apă și glicerină diluată.

În cazul obiectelor vegetale cu spații intercelulare mari cum sînt, de exemplu, organele vegetative ale hidrofitelor, este indicată includerea lor în celoidină. Aceasta se poate utiliza foarte bine și în cazul studierii lemnului putred care nu se poate prelucra altfel.

Analiza secțiunilor efectuate cu briciul prin material vegetal proaspăt, în care conținutul celular nu a suferit modificări prea mari, se poate face folosind ca mediu de includere a acestora, 1—2 picături de apă de robinet. Dacă secțiunile s-au făcut prin material fixat și nu se urmărește studierea conținutului celular al acestora, atunci este mai indicată includerea secțiunilor în glicerină sau în glicerină diluată cu apă, pentru intensificarea refringenței lor.

6.2.3. ELIMINAREA CONȚINUTULUI CELULAR ÎN SECȚIUNILE EFECTUATE CU BRICIUL

Îndepărtarea conținutului celular din preparatele histologice se poate face aproape complet, apărînd astfel pereții celulari mult mai clari. În acest scop, secțiunile de mînă se includ adesea pe lamă în 1—2 picături din amestecul :

cloralhidrat		160 g
apă distilată		100 ml
glicerină		50 ml

Sub acțiunea acestei soluții amidonul este dizolvat după ce s-a îmbibat cu ea. Datorită faptului că indicele de refracție al amestecului este destul de bun, este posibilă și examinarea unor secțiuni de mînă mai groase, cu condiția ca obiectele să fi fost secționate perfect transversal.

Soluția de clorhidrat din acest amestec contribuie la dilatarea ușoară a pereților celulari, ceea ce îi face și mai vizibili. Astfel, în fasciculele vasculare elementele xilemului (lemnului), cu pereții lor gălbui, se deosebesc clar de pereții celulari ai floemului (liberului), care apar alburii. Trebuie însă ca în cazul utilizării amestecului de mai sus să avem grijă ca obiectivele microscopului să nu vină în contact cu acesta, deoarece le corodează.

Secțiunile care au fost analizate mai întâi în soluția de clorhidrat și glicerină, pot fi transformate ulterior în preparate durabile prin includerea lor în gelatină glicerinată sau în soluție de alcool polivinilic.

În cercetările histologice se recomandă cel mai mult efectuarea secțiunilor cu briciul (secțiuni de mână) și includerea lor în gelatină glicerinată, în soluție de clorhidrat sau în soluție de alcool polivinilic.

Pentru contrastarea și mai accentuată a pereților celulari lignificați față de cei nelignificați sînt necesare adeseori colorații speciale care să evidențieze aceste deosebiri. În aceste cazuri însă, pentru menținerea colorațiilor, secțiunile trebuie incluse în rășini sintetice. În cursul deshidratării secțiunilor prin trecerea lor prin seria de alcool, umflarea naturală a pereților celulari dispăre, ceea ce scade claritatea preparatelor.

Deoarece materialele vegetale proaspete absorb greu sau aproape deloc coloranții, se recomandă fixarea lor cu următoarea soluție :

alcool etilic	80 ml
acid acetic glacial	15 ml
formol 40%	5 ml

Fixarea secțiunilor în această soluție durează aproximativ 15 minute, după care se spală cca. 2 minute cu apă de robinet, schimbînd-o de 3 ori. După această ope-

rație preliminară, urmează colorarea secțiunilor cu diferiți coloranți, în funcție de scopul urmărit.

În secțiunile colorate, pereții celulari apar, de asemenea, foarte clari dacă înainte de colorare se îndepărtează conținutul celular. În acest scop secțiunile se introduc fie într-o soluție de 160 g clorhidrat în 100 ml apă de robinet, fie în *apă de Javelle*. Aceasta din urmă se prepară proaspătă din 18 g clorură de var și 100 ml apă, soluția fiind lăsată să stea 15 minute. Apoi se amestecă această primă soluție cu o soluție de 15 g K_2CO_3 în 100 ml apă, amestecul acestor două soluții făcându-se într-o capsulă de porțelan mai mare. Precipitatul voluminos rezultat se separă prin filtrare sau centrifugare de lichidul obținut care reprezintă *apa de Javelle*.

Secțiunile obținute și puse în apă distilată se transferă apoi în *apă de Javelle* proaspătă, care este activă numai dacă miroase puternic a clor. În *apa de Javelle* secțiunile se lasă 15 minute, până la decolorarea lor completă. După aceea se pun secțiunile timp de 15 minute în apă slab acidulată (10 ml apă distilată + 1 picătură de acid acetic glacial), după care se spală de două ori și se montează în glicerină sau gelatină glicerinată.

6.2.4. REACȚII SIMPLE DE IDENTIFICARE

A CONSTITUENȚILOR PERETELUI CELULAR

Recațiile de identificare se efectuează în general pe secțiuni făcute cu briciul (secțiuni de mînă).

Celuloza, constituentul de bază al peretelui celular vegetal, poate fi pusă în evidență la microscopul cu fluorescență, de obicei prin fluorescența primară galben-verzuie. Această culoare poate fi însă mascată de către diferite substanțe care au o fluorescență de altă culoare.

Punerea în evidență a celulozei se poate face cu reactivul specific, cloriodura de zinc.

Lignina, care intră în componența pereților țesutului conducător lemnos și a sclerenchimului, se poate identifica prin diferite reacții de colorare.

Suberina și *cutina* se pot pune în evidență de obicei cu o soluție de Sudan III, însă sensibilă este reacția cu Sudan IV.

Substanțele proteice pot fi colorate cel mai bine folosind ca material de studiu obiectele de natură vegetală fixate în alcool sau în alcool-formol-acid acetic (AFE), dacă acestea au fost decolorate în prealabil în apă de Javelle. Fără această decolorare, rezultatul reacției de colorare nu este totdeauna sigur. Pentru colorarea pectinelor se pot folosi: roșu de ruteniu, albastru de metil, safranină.

6.2.5. METODE DE CLARIFICARE A SECȚIUNILOR NECESARE ÎN CERCETĂRILE ANATOMICE

Clarificarea secțiunilor efectuate prin diferite organe ale plantelor superioare constă în îndepărtarea conținutului celular prin acțiunea unor reacții chimice, obiectele devenind astfel transparente. Diferitele metode de clarificare a secțiunilor se pot utiliza numai când se studiază structura pereților celulari, ceea ce este necesar îndeosebi în cercetările de anatomie vegetală. Astfel, aceste metode se folosesc când trebuie urmărit traseul fasciculelor vasculare în tulpini, ramuri sau în frunze, dar sînt utilizabile și în studierea țesuturilor meristematice. Din cauza grosimii relativ mari a secțiunilor, la analiza microscopică a acestora nu se pot folosi obiecti-

vele cele mai puternice, fapt pentru care în asemenea preparate nu se pot studia detaliile structurale cele mai fine (de exemplu, punctuațiile).

Obținerea unei clarificări se poate face în modul cel mai simplu scoțînd aerul cu ajutorul unei trombe de apă din frunzele care conțin mult aer. În alte cazuri, obiectele decolorate cu alcool se clarifică cu o leșie, după care se colorează. Clarificarea și colorarea se fac uneori simultan cu aceeași soluție.

Clarificarea secțiunilor efectuate prin tulpini, ramuri și frunze nu prea dure, ca cele de la majoritatea plantelor ierboase, se face după *metoda Fuchs*. În acest caz, se prepară mai întîi o soluție de fuchsină, prin dizolvarea a 1 g diament fuchsină în 100 ml apă clocotită, după care se răcește și se adaugă 10 g NaOH, fără a se filtra.

Clarificarea secțiunilor. Se extrage clorofila din secțiuni prin menținerea acestora, timp de mai multe zile, în alcool 70%. Acest proces se poate accelera prin introducerea lor în termostat (etuvă) la 60°C.

Materialul astfel decolorat, care este cam fragil, se înmoaie mai întîi în apă de robinet, după care se trece în soluția de clarificare și colorare, unde se lasă cca 12 ore la o temperatură de 60°C. Se spală apoi la un jet slab de apă de robinet, de asemenea 12 ore.

Deshidratarea secțiunilor se face trecîndu-le prin următoarele concentrații de alcool: 50%, 70% și 95% în decurs de aproximativ 12 ore. Obiectele se trec dintr-o concentrație în alta pînă în momentul cînd soluția de alcool (de o anumită concentrație) în care se află nu se mai colorează în roșu. De meticulozitatea cu care se realizează această deshidratare, depinde claritatea colorației.

Se deshidratează în continuare secțiunile timp de 1—2 ore cu alcool izopropilic absolut.

În funcție de mărimea obiectelor, acestea se tratează 1—15 minute cu un amestec obținut din 3 părți alcool izopropilic absolut+1 parte HCl concentrat, după care culoarea inițială roșie a pereților celulari lignificați virează astfel în negru. Se spală din nou secțiunile timp de o oră cu alcool izopropilic absolut, după care se includ în soluție de rășină sintetică. Pentru ca lamela să nu se deplaseze pînă la întărirea rășinei, secțiunea fiind relativ groasă, se folosește o clemă tip Stosch.

În urma efectuării tuturor acestor operațiuni pereții celulari lignificați apar colorați în roșu închis negricios și în unele cazuri la fel cu pereții celulelor stomatice. În schimb, pereții celulelor parenchimatice ale mezofilului sînt slab colorați, putînd fi totuși bine observați.

Tratarea cu amestecul alcool-HCl poate fi suprîmă-tă, dar în acest caz secțiunile devin roșii, iar elementele xilemului nu sînt contrastate prea bine; în schimb, pereții celulelor parenchimatice sînt mai puternic colorați.

Frunzele clarificate după această metodă și colorate, pot fi incluse în rășini sintetice pe lamă și apoi acoperite cu lamela, dar mai pot fi montate într-o cantitate suficientă de rășină sintetică între două geamuri pentru diapozitive, în vederea proiectării lor. În felul acesta se poate urmări traseul fasciculelor vasculare pe întreaga suprafață foliară.

În cazul *obiectelor vegetale cu epiderma deosebit de rezistentă*, cum sînt frunzele multor xerofite, acestea trebuie clarificate după aceeași metodă Fuchs, cu

o soluție de NaOH, fără adaus de colorant, înainte de a fi tratate cu amestecul NaOH-fuchsină.

Clarificarea. Secțiunile decolorate ca mai înainte, cu alcool 70%, se trec într-o soluție de NaOH 15% și apoi se introduc în termostat la 60°C, 2—3 zile unde devin complet translucide, cu excepția pereților celulari lignificați.

După aceea, secțiunile se introduc, fără spălare, timp de 24 ore, într-o soluție formată din 1 g fuchsină acidă și 15 g NaOH în 100 ml apă.

După colorare, se spală bine secțiunile cu apă de robinet, după care se deshidratează și se tratează în continuare la fel ca mai sus.

Dacă în afară de pereții celulari lignificați trebuie *contrastati* mai clar și cei nelignificați, atunci după tratarea secțiunilor cu amestecul HCl-izopropanol și spălarea cu izopropanol pur, acestea se colorează cu o soluție de *verde rapid* (fast green) în alcool izopropilic absolut. Astfel, claritatea elementelor xilematice este oarecum redusă.

6.2.6. CLARIFICAREA OBIECTELOR FOARTE CORIACEE

Asemenea obiecte sînt, de exemplu, frunzele gimnospermelor.

La metoda indicată de către Shobe și Lersten, pentru aceste obiecte se folosesc separat soluțiile de clarificare și colorare. La început obiectele se lasă în alcool de 70% pînă devin incolore.

Clarificarea. Obiectele devenite incolore se trec într-o soluție apoasă de NaOH 10%, apoi se introduc în termostat la 60°C, unde se lasă pînă devin transparente, cu excepția elementelor lignificate. Soluția de

NaOH trebuie schimbată însă mai des deoarece ea devine brună și se formează precipitate.

În funcție de rezistența materialelor vegetale, procesul de clarificare se desfășoară cu viteză diferită. Astfel, frunzele de *Taxus* (tisă) devin transparente după câteva zile, în timp ce frunzele de *Pinus* (pin), numai după două săptămîni. Clarificarea unor frunze foarte coriacee cum sînt cele de *Cycas*, se poate accelera mult tăindu-le în bucăți cît mai mici.

Continuarea prelucrării acestor obiecte se face numai atunci cînd ele nu mai prezintă pete brune. Dacă nici după două săptămîni nu s-a obținut aceasta, atunci clarificarea se realizează prin scufundarea lor pentru scurt timp (maximum 5 minute) în apă de clor, care trebuie să se facă cu multă prudență, întrucît soluția are efect macerator.

Ulterior, soluția de NaOH și eventual apa de clor sînt eliminate din țesuturi prin spălarea lor repetată cu apă de robinet; dacă rămîn urme de NaOH, acestea determină o decolorare rapidă a colorațiilor care urmează. Se spală apoi cu apă distilată și după această ultimă spălare, secțiunile pot fi colorate.

La colorare, secțiunile de mîna se transferă ușor cu ajutorul unei pense dintr-o soluție în alta, evitîndu-se pe cît posibil deteriorarea acestora. De aceea, pentru colorarea secțiunilor se recomandă metode care necesită cît mai puține transferări, adică cît mai puține soluții prin care să fie trecute.

6.2.7. STUDIAREA FLUORESCENȚEI PRIMARE ÎN SECȚIUNILE EFECTUATE CU BRICIUL ȘI LA MICROTOM

Secțiunile prin tulpini, ramuri, rădăcini etc. se pot observa foarte bine la microscopul cu fluorescență, utilizînd de preferință lumina ultravioletă. În majoritatea

cazurilor se folosesc în acest scop secțiuni făcute prin material proaspăt și incluse în apă sau glicerină.

Culorile de fluorescență care se observă variază în funcție de țesuturi. Astfel, cuticula apare alburie; pereții epidermei apar în nuanțe de albastru deschis, parenchimul cortical se colorează în verde sau brun, cloroplastele în roșu intens și liberul, în albastru. Lemnul (xilemul) se observă în diferite culori: albastru-verzui, violet și chiar în galben. Culoarea de fluorescență a lemnului variază de obicei cu gradul de lignificare a pereților, precum și cu vârsta lemnului: cel secundar fiind mai intens fluorescent decât cel primar. Fibrele sclerenchimatice cu pereții celulozici se observă în nuanțe de verde gălbui.

În general, culorile de fluorescență se modifică sub acțiunea diferitelor substanțe incluse în țesuturile respective. Cu toate acestea, analiza secțiunilor fitoanatomice în fluorescență primară contribuie la identificarea rapidă a diverselor țesuturi.

Obiectele spălate se transferă apoi, pentru câteva ore, într-o soluție de 250 g clorhidrat dizolvat în 100 ml apă, pînă devin sticloase. În această soluție, obiectele pot fi conservate mai mult timp. Înainte de colorare este necesară îndepărtarea completă a clorhidratului, prin spălarea repetată cu apă de robinet.

Obiectele foarte coriacee trec direct din apă de robinet în alcool etilic de 95%, iar cele mai fine se deshidratează trecîndu-se treptat prin seria de alcool pînă la 95%.

Colorarea acestora se face timp de 1 minut într-o soluție de 1 g safranină dizolvată în 100 ml alcool etilic 95%. Se spală apoi cu alcool de aceeași concentrație și se supracolorează cca 2 secunde cu o soluție de „fast green” (0,2 g în 100 ml de alcool 95%).

Se spală din nou cu alcool 95% și se deshidratează complet cu izopropanol absolut.

Obținerea unei bune colorări se poate face eventual prin diferențiere într-un amestec în părți egale de alcool izopropilic absolut și xilen. După clarificarea cu xilen pur, obiectele pot fi incluse într-o soluție de rășină sintetică.

Drept urmare, pereții celulari lignificați și pereții celulelor stomatice apar roșii, iar pereții celulozici verzi. În timpul preparării, materialul devine foarte casant, de aceea trebuie foarte multă atenție la transferarea lui dintr-o soluție în alta.

6.2.8. OBȚINEREA UNOR PREPARATE PRIN INCINERARE

Evidențierea numai a impregnărilor cu substanțe minerale ale pereților celulari necesită îndepărtarea aproape completă a părților organice. Aceasta se face mai ales prin ardere, iar uneori prin acțiunea unor oxidanți puternici descriși la diatomee.

Incinerarea materialului de studiu. Pentru a obține o incinerare cât mai rapidă și uniformă, materialul trebuie să fie bine uscat. De aceea, cel mai bun material pentru această metodă este cel de herbar.

Incinerarea se face pe o tablă de platină, într-un creuzet de porțelan sau chiar pe lamă; în cazul din urmă, acțiunea căldurii nu trebuie să fie prea puternică. Ca să prevenim fuzionarea elementelor scheletice, încălzirea materialului nu trebuie să dureze mai mult decât strictul necesar și să nu se utilizeze nici o temperatură prea ridicată.

Materialul uscat este carbonizat mai întâi cu o flacără mică, luminoasă a becului Bunsen. Apoi se face calcinarea cu o flacără mai puternică. De multe ori, în urma

calcinării, nu trebuie să se obțină o cenușă perfect albă, deoarece unele formațiuni grosiere din peretele celular devin chiar mai clar vizibile datorită particulelor de carbon depuse, decît în stare complet calcinată. Numai detaliile cele mai fine se observă pe o cenușă complet albă.

După o asemenea calcinare, reziduul obținut conține de obicei atît silice cît și carbonați. Pentru a se analiza scheletul silicios pur, materialul se pune încă înainte de calcinare pentru cîtva timp (durata depinde de mărimea obiectului și trebuie verificată) în HCl 5%, după care se spală cu apă de robinet și se usucă. Urmează apoi calcinarea. Dacă materialul calcinat îl constituie schelete silicioase foarte rezistente, cum sînt cele din tulpinile de *Equisetum*, carbonații pot fi extrași din cenușă și după calcinare, pentru aceasta, cenușa de pe lamă se tratează cu HCl diluat.

6.2.9. INCLUDEREA SCHELETELOR SILICIOASE

Unele structuri silicioase grosiere sau cenușa, colorate cu resturi de cărbune, pot fi incluse în soluțiile obișnuite de rășini sintetice. Pentru cercetarea detaliilor mai fine în cenușe albe se alege, ca și pentru diatomee, un mediu cu refringentă mare, de exemplu *styrax*. Uneori se obține un contrast mai bun la microscopul cu contrast de fază decît în cîmpul luminos normal.

6.2.10. IZOLAREA CUTICULEI FRUNZELOR

Pentru elucidarea unor probleme de sistematică, în special, este edificatoare analiza cuticulei frunzelor. Pentru aceasta se iau frunze proaspete, fixate sau uscate, care se taie în bucăți mici și se pun într-o soluție con-

centrată de acid cromic în HNO_3 concentrat. Fragmentele de frunze tratate astfel devin rapid brune pînă la negricioase. Menținerea lor în acid crom-azotic trebuie să dureze pînă la distrugerea substanțelor organice în afară de cuticulă, ceea ce durează 1—4 ore, în funcție de natura materialului. După aceea, cuticula plutește la suprafața soluției ca o peliculă, care se trece pe o lamă și apoi se spală cu apă de robinet.

Cuticula astfel spălată poate fi analizată imediat într-o picătură de apă. Un contrast mai puternic se obține prin introducerea pe sub lamela preparatului a unei picături dintr-o soluție de cloro-iodură de zinc, ceea ce duce la colorarea cuticulei în maroniu.

Obținerea unui preparat durabil din cuticula izolată se realizează prin colorarea acesteia cu soluție de Sudan III, folosită pentru cutină, după care se include în gelatină glicerinată. Cel mai bun contrast însă se obține prin observarea cuticulei în contrast de fază după includere în apă de robinet.

6.2.11. ȚESUTURI MERISTEMATICE

Ca material de studiu pentru țesuturile meristematice se folosesc vîrfuri vegetative de tulpini, ramuri și rădăcini, precum și muguri floral; toate acestea fiind formate din diferite tipuri de meristeme. În acest scop se poate utiliza atît material proaspăt cît și material fixat în alcool-formol-acid acetic (AFE).

Una din metodele cele mai simple folosite, îndeosebi în scopuri didactice, în studiul țesuturilor meristematice, constă în clarificarea acestora cu soluție de cloralhidrat.

În acest scop se ia un mugure terminal al unei ramuri sau tulpini și cu ajutorul a două ace, folosind microscopul binocular, se îndepărtează toate scvamele protectoare ale acestuia pînă la vîrfurile vegetative. Acesta se pune

apoi pe o lamă într-o picătură de soluție de cloralhidrat și se acoperă cu o lamelă. Se încălzește, după aceea, lama pînă la fierbere deasupra unei flăcări mici, pînă cînd vîrfurile vegetative devin destul de transparente. După răcire se poate trece imediat la analiza microscopică a vîrfurilor vegetative. Din acest material se pot obține preparate durabile (permanente) după includerea obiectelor clarificate în gelatină glicerinată.

Cu cloralhidrat se pot clarifica și vîrfuri de rădăcini, încălzindu-se ca mai sus, pe o lamă într-o picătură de soluție. Cloralhidratul se pretează, de asemenea, la studiul dezvoltării frunzei. Uneori însă este necesară scoaterea aerului din materialul pus în soluția de cloralhidrat printr-un dispozitiv de evacuare și numai după aceea se continuă tratarea acestuia pe lamă.

2.6.11.1. CLARIFICAREA CU APĂ DE JAVELLE

Vîrfurile de rădăcini sau conurile vegetative se pun într-o sticlă de ceas cu apă de Javelle proaspătă, pînă devin perfect translucide. Analizate într-o picătură de apă de Javelle se observă că pereții celulari devin clar vizibili.

2.6.11.2. CLARIFICAREA CU FENOL

O metodă, de asemenea, foarte simplă pentru clarificarea vîrfurilor vegetative folosește soluția de fenol, care se prepară amestecînd 90 g fenol cristalizat cu 10 ml apă și încălzind pînă amestecul rămîne în permanență fluid. Vîrfurile vegetative din muguri sau vîrfurile rădăcinii se pun pe o lamă în 1—2 picături din această soluție și se aco-

peră cu o lamelă. Fără încălzire, clarificarea acestora se produce în 5—10 minute și în asemenea preparate se văd foarte clar pereții celulari și nucleeele.

6.2.11.3. CLARIFICAREA CU NaOH URMATĂ DE COLORARE

Această metodă necesită mai mult timp de lucru decât cele precedente și se folosește de obicei la efectuarea preparatelor durabile incluse în rășini sintetice.

Vîrfurile vegetative de la care s-au îndepărtat catafi-
lele (scvamele protectoare) se fixează ca de obicei cu un amestec de alcool-formol-acid acetic.

Se prepară 3 soluții (A, B, C) în modul următor :

Soluția A : 10 g NaOH se dizolvă în 100 ml apă distilată ;

Soluția B : 1 g tanin se dizolvă în 100 ml apă distilată, la care se adaugă puțin timol ca antiseptic ;

Soluția C : 1,5 g FeCl_3 se dizolvă în 100 ml apă distilată.

Vîrfurile vegetative se pun întâi în soluția de NaOH, care se introduce în termostat la 60°C , unde se lasă să acționeze asupra țesuturilor meristematice timp de 24—48 ore.

După trecerea acestui timp, se spală bine obiectele cu apă de robinet, schimbată de mai multe ori, astfel ca să nu rămână urme de NaOH în țesuturi, care pot compromite colorarea acestora.

După spălare, vîrfurile vegetative se pot colora imediat sau se păstrează timp îndelungat în acool de 70%.

Pentru colorare se introduc vîrfurile vegetative timp de 1 minut mai întâi în soluție de tanin, după care se spală bine cu apă de robinet.

Se introduc după aceea în soluție de FeCl_3 , unde obiectele se lasă pînă cînd devin negre-albăstrui, ceea ce se produce de obicei în 30 secunde, după care se spală din nou foarte bine tot cu apă de robinet.

Ca să se evite contracții puternice ale țesuturilor meristematice, se deshidratează apoi vîrfurile vegetative, trecîndu-le prin următoarea serie de alcool: 50%, 70%, 85%, 92% și alcool absolut.

După aceea se includ cel mai bine, într-o soluție de rășină sintetică mai vîscoasă, de exemplu în *Rhenobistol*.

În urma tuturor acestor operațiuni, pereții celulelor meristematice apar negri-albăstrui. Prin utilizarea acestei metode, elementele xilematice din preparat apar suficient de clare, dar pentru a accentua și mai mult contrastul dintre acestea, se supracolorează cu safranină.

Obiectele se introduc într-o soluție formată din 0,5 g safranină dizolvată în 50 ml xilen și 50 ml alcool izopropilic absolut, unde se lasă 5—30 secunde. Excesul de colorant se spală apoi repede cu un amestec de alcool-xilen.

După această colorare, pereții celulari lignificați apar acum colorați în roșu.

Țesuturile meristematice se studiază însă mai bine pe material inclus în parafină și secționat la microtom. Pentru aceasta trebuie ca meristemele respective să fie fixate cu amestecul alcool-formol-acid acetic, dar pot fi utilizate și amestecuri cu acid cronic, ca fixatorul Navașin-Bruun sau acid crom-acetic.

Metoda includerii în celoidină nu se recomandă în studiul țesuturilor meristematice fiindcă celoidina nu pătrunde prea bine în obiectele respective.

6.3. TEHNICI EMBRIOLOGICE

În cercetările de embriologie s-au elaborat relativ puține metode speciale de efectuarea preparatelor, deoarece în asemenea cercetări se aplică în majoritatea cazurilor tehnicile folosite în anatomie și citologie. De exemplu, studiul stadiilor de dezvoltare ale florilor sau inflorescențelor se face pe preparate clarificate complet sau pe secțiuni efectuate la microtom, procedându-se la fel ca țesuturile meristematice (vezi pag. 276).

6.3.1. MICROSPORII ȘI GAMETOFITUL MASCULIN

6.3.1.1. DEZVOLTAREA MICROSPORIILOR (MICROSPOROGENEZA)

Stadiile cele mai timpurii în dezvoltarea microsporilor, premergătoare meiozei, se studiază pe material inclus în parafină și apoi secționat în microtom sau pe secțiuni efectuate prin material inclus în diferite mase plastice, folosindu-se de obicei metodele utilizate în citologie (vezi pag. 252).

Microsporogeneza începe în celule mamă ale microsporilor (celule microsporogene) relativ devreme și se termină de obicei atunci când anterele nu mai au culoarea verde pur. Diferitele faze de diviziune meiotică se pot observa cel mai bine când se fixează muguri florali de dimensiuni potrivite într-o zi foarte caldă, precedată de o perioadă umedă și rece.

În cazul pomilor fructiferi, pentru studiul meiozei, mugurii florali se recoltează în faza umflării lor. Acestora li se îndepărtează catafilele, iar florilor dintr-un mugure li se elimină sepalele și petalele.

La *Gramineae*, aprecierea stadiului de dezvoltare a celulelor mame polinice corespunde întrucâtva cu lun-

gimea spicului în burduf: astfel la grâu, cînd spicele ating lungimea de 4—6 cm, iar la secară de 6—7 cm, ele pot fi recoltate pentru studiul microsporogenezei.

Meioza se studiază mai ales pe preparate obținute prin strivire sau ca frotiu, dar și pe material împarfinat și secționat la microtom. Pentru observarea primei mitoze în granule de polen, cel mai bine se pretează un preparat colorat cu acid carmin-acetic sau prin reacția Feulgen.

Microsporii dezvoltati devin granule de polen care pot fi analizate atît pe material proaspăt, dar și pe material de herbar.

6.3.1.2. PREPARATE CU GRANULE DE POLEN

Asemenea preparate sînt deosebit de importante pentru identificarea taxonului de la care provin. Pentru aceasta, polenul se include în apă sau mai bine în glicerină. Preparate durabile cu granule de polen se obțin prin includerea acestora în gelatină glicerinata, existînd însă în acest caz riscul ca unele granule de polen să-și schimbe cu timpul forma, de exemplu printr-o ușoară umflare.

Mult mai simplă și practică este includerea granulelor de polen într-o soluție mai concentrată de clorhidrat, care se poate folosi la incluzionarea polenului atît proaspăt cît și uscat, din material de herbar. Acest mediu de includere distruge conținutul granulei, făcînd-o astfel transparentă, ceea ce permite analiza amănunțită a sporodermei și mai ales a structurii acesteia. Este deosebit de indicat acest mediu de includere și pentru cazurile cînd granulele de polen sînt în număr foarte mic, întrucît pe parcursul includerii lor nu se pierde din polen.

Metoda cea mai mult întrebuințată în prezent este metoda acetolizei elaborată de *Erdtman G.* (1959), care este destul de complicată și necesită, în primul rînd, o cantitate mare de polen.

În cercetările privind ecologia polenizării se recomandă a analiza polenul uscat inclus în aer, deoarece multe granule de polen sînt transportate de vînt și insecte în stare uscată.

6.3.1.3. DETERMINAREA VIABILITĂȚII ȘI CAPACITĂȚII DE GERMINARE A POLENULUI

Viabilitatea polenului variază la diferite plante și în condiții naturale majoritatea granulelor de polen rămîn viabile numai cîteva zile sau săptămîni, fără ca aceasta să constituie o regulă general valabilă.

Mentținerea viabilității polenului reprezintă o problemă deosebit de importantă în încrucișarea diferiților taxoni pentru crearea de forme noi, valoroase. În acest scop, este necesară determinarea viabilității polenului care se face prin diverse metode. Pînă în prezent cea mai eficace metodă pentru aceasta este colorarea polenului cu trifenil-tetrazol-clorid. Această metodă se bazează pe faptul că, culoarea sării de tetrazoliu este redusă de către dehidrazele din polenul viu la culoarea roșie a formazanului. În acest sens se folosește amestecul fosfatic Sørensen AIN cu $\text{pH} = 7,2$, care reprezintă *soluția tampon*, precum și soluția 0,1% de *trifenil tetrazol clorid*.

Soluția tampon se prepară din 7 părți de soluții de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (11,8 g la 1 litru apă distilată) și 3 părți soluție de K_2HPO_4 (13,6 g la 1 litru apă distilată).

Se ia o lamă port-obiect de sticlă pe care se scutură polen. Se acoperă cu 1—2 picături de soluție tampon alcătuită din amestecul fosfatic Sörensen AIN, lăsându-se astfel timp de 3—4 minute. Excesul de amestec se înlătură cu hîrtie de filtru și apoi se adaugă 1—2 picături de soluție trifenil tetrazol clorid 0,1%. Se acoperă preparatul cu lamela și se introduce lama cu polen în termostat la 37°C, timp de 20—30 minute. În acest timp, granulele de polen viabile se colorează în roșu (roz), iar cele neviabile în galben.

Orientarea cu privire la capacitatea de germinare a granulelor de polen se face de obicei destul de simplu, prin colorarea acestora cu o soluție de carmin-acetic. În acest scop, se iau antere mature, care se strivesc pe o lamă de sticlă într-o picătură de carmin-acetic. Granulele de polen viabile se colorează în roșu, iar cele moarte apar incolore și mai mult sau mai puțin zbîrcite. Menționăm însă că în felul acesta se pot obține numai date orientative.

În granulele de polen viabile și mai ales în cele bogate în amidon, poate fi determinat ușor și numărul nucleelor, cu soluție de carmin-cloral.

Soluția de carmin-cloral se prepară din 1 g carmin pulvis ce se dizolvă în 60 ml alcool etilic de 95%. la care se adaugă 5 ml HCl 25%. Acest amestec se fierbe cca 30 minute în baie mariană, iar după răcire i se adaugă 50 g cloralhidrat. Se filtrează apoi și soluția obținută se păstrează bine timp îndelungat.

Din această soluție se iau 1—2 picături care se pun pe o lamă de sticlă, deasupra căreia se scutură polen. Se acoperă preparatul cu o lamelă și se lasă astfel cîteva ore. În acest timp, granulele de polen se clarifică, iar nucleul germinativ și de obicei și cel vegetativ, se colorează din ce în ce mai intens în roșu. La unele

plante colorarea nucleelor din granulele de polen reușește numai dacă preparatul este ușor încălzit.

În urma unei asemenea colorări, nucleeele sînt colorate mai mult sau mai puțin în roșu. Colorația este destul de intensă pentru observații de orientare și se intensifică cu timpul. Dacă între timp soluția se evaporă, ea poate fi completată prin adăugarea cîtorva picături la marginea lamelei, ceea ce necesită însă atenție, deoarece carmin-cloralul migrează ușor pe suprafața lamelei.

Nucleeele și cromozomii din granulele de polen pot fi puse în evidență surprinzător de bine și prin *metoda Braune*, modificată de *Etzold*. Astfel, se pune pe lamă o picătură de amestec alcool-acid acetic glacial (3:1), în care se desface o anteră. Cînd amestecul fixator este aproape complet evaporat se adaugă pe materialul de studiu o picătură de hemalaun *Mayer*. Se așază lamela deasupra preparatului, se aduce la marginea lamelei o picătură dintr-o soluție apoasă de cloralhidrat neutralizat cu CO_3Ca și se lasă să difuzeze în preparat. În final, nucleeele și cromozomii din granulele de polen apar colorați în albastru închis.

6.3.1.4. SECȚIUNI EFECTUATE LA MICROTOM PRIN GRANULE DE POLEN MATURE

În acest scop se folosesc antere într-un stadiu de dezvoltare corespunzător, adică antere mature, dar închise, care se includ în parafină și prin care se fac secțiuni transversale. Colorarea acestor secțiuni se realizează foarte bine la numeroase plante, cu safranină și verde de lumină, cu safranină-cristal violet-verde de lumină sau cu hematoxilina și safranină.

6.3.1.5. POLENUL DIN MIERE

Calitatea mierei poate fi testată printre altele, după granulele de polen prezente în probă. Pentru testare se ia o parte miere care se amestecă, după consistență, cu 2—10 părți apă și apoi se centrifughează. Granulele de polen care prezintă balonașe mari cu aer, plutesc la suprafața apei, iar celelalte se depun sub formă de sediment încât ele pot fi aduse pe lama port-obiect cu ajutorul unei bucle de sîrmă.

6.3.1.6. GAMETOFITUL MASCULIN

Urmărind în serie evolutivă studiul gametofitului masculin, cel de la Pteridofite (ferigi) se pretează cel mai bine la preparate totale. Acesta se fixează cu amestecul Pfeiffer sau cu acidul cromacetic slab și se include în gelatină glicerinată, fără colorare sau se colorează în prealabil cu crom-alaun și alizarinviridină.

În preparatele astfel obținute, anteridiile se studiază cel mai ușor. Pentru aceasta se dezintegrează eventual gametofii masculini și se colorează pe o lamă cu acid carmin-acetic.

Dacă se urmărește cunoașterea particularităților structurale ale gametofitului masculin și eventual procesul de spermiogeneză, atunci obiectele se fixează cu amestecurile menționate anterior sau cu amestecul Flemming. Se includ în parafină și apoi se secționează la microtom.

Colorarea secțiunilor se face fie cu hematoxilină ferică, fie cu combinația safranină-cristal violet verde de lumină. Gametofii masculini pot fi fixați și cu OsO_4 sau cu aldehidă formică, fiind incluși apoi în mase plastice.

6.3.1.7. STUDIUL TUBURILOR POLINICE

Studiul tuburilor polinice se realizează fie pe preparate obținute din stile, fie că se fac culturi speciale de tuburi polinice.

Tuburi polinice în stile. Există diferite metode de punere în evidență a tuburilor polinice în stilul gineceului, unele dintre acestea bazându-se pe colorarea cazei care impregnează tuburile polinice.

Evidențierea acestora este asemănătoare cu cea a hifelor de ciuperci în țesuturile plantelor superioare. De aceea trebuie folosite metode care produc o contrastare cât mai accentuată între tubul polinic și țesuturile stilului. Aceasta se obține cel mai bine pe un preparat complet clarificat, dar și pe secțiuni efectuate la microtom.

6.3.1.8. EFECTUAREA PREPARATELOR TOTAL CLARIFICATE

În multe cazuri este suficient ca stilele secționate longitudinal să fie clarificate cu lactofenol și colorate apoi cu lactofenol și albastru de anilină. Astfel, citoplasma tuburilor polinice se colorează în albastru, iar țesuturile stilului rămân necolorate.

Colorarea stilelor se poate face și cu soluție de carmin-acetic 10%. În această soluție se lasă materialul timp de 24 ore, după care se spală în hipoclorit de K. de la o jumătate de oră pînă la 24 ore. Stilele trebuie însă strivite bine între lamă și lamelă cu capătul unui creion sau cu baghetă de sticlă, adăugînd mereu între timp cîte o picătură de carmin-acetic, pentru a accentua colorarea.

Prin folosirea acestei metode, tuburile polinice se colorează în roșu, în timp ce peretele canalului stilului se colorează foarte slab.

6.3.1.9. COLORAREA CALOZEI DIN TUBURILE POLINICE. METODA ESCHRICH

Se prepară în primul rînd o soluție de rezorcină și amoniac prin încălzirea timp de 10 minute a 3 g rezorcină în 200 ml apă distilată și 1 ml amoniac de 33%. Acest amestec trece după 1—3 zile din culoarea roșie în verde-albăstrui, avînd o ușoară fluorescență de verde-murdar. Atunci se filtrează și se încălzește pînă nu mai emană vapori de amoniac. În momentul utilizării colorantului, acesta se diluează prin adăugarea a 1—2 picături în 10 ml apă distilată în care se pun stilele. După 30 secunde, caloza tuburilor polinice se colorează în albastru (ca cerul), iar după 1—2 minute pereții lignificați ai țesutului conducător lemnos din stil se colorează în cenușiu albăstrui.

Colorarea dopurilor de caloză din tuburile polinice La colorarea acestora se folosește combinația din albastru de rezorcină cu galben Martius. Această colorare este indicată mai ales atunci cînd se pot observa și regiunile posterioare ale tuburilor polinice, de obicei lipsite de citoplasmă.

Tuburile polinice, deosebit de bogate în amidon, devin clar vizibile după clarificarea și colorarea stilelor cu iod-fenol.

În secțiunile efectuate la microtom, tuburile polinice, ca și hifele miceliene în țesuturile plantei gazdă, se pot urmări numai pe distanțe scurte.

Colorarea secțiunilor prin stile incluse în parafină (secțiuni cît mai groase) se face prin utilizarea de colorări multiple, de exemplu safranină-verde de lumină sau soluția Pianese. Dacă ne interesează numai nucleeele generative, atunci secțiunile se colorează după reacția Feulgen.

Granulele de polen germinează în multe cazuri și pe un mediu nutritiv artificial adecvat. Dacă soluția nutritivă se aplică direct pe o lamă de sticlă, germinarea polenului și creșterea tuburilor polinice se poate urmări direct la microscop.

În ceea ce privește *soluțiile nutritive*, în majoritatea cazurilor se folosesc soluții de zaharoză în apă, dar concentrația trebuie determinată experimental pentru fiecare specie, ea variind între 1%—30%, la majoritatea speciilor polenul germinează în soluții de zaharoză între 10 și 20%.

Există și specii de plante al căror polen germinează în apă curată de robinet și tuburile lor polinice continuă să crească în apă fără a plesni.

De obicei, în soluții cu concentrații mai mici de zahăr, polenul germinează mai repede, iar în soluții mai concentrate, tendința de crăpare și plesnire a granulelor și tuburilor polinice, este mult mai redusă. La multe specii germinarea polenului este mult stimulată prin adăugarea, în soluția nutritivă, a unei urme de acid boric sau acid citric.

Foarte mult se folosesc în locul soluțiilor nutritive lichide și *medii solide* pentru germinarea polenului. Acestea se obțin prin adăugarea de agar-agar 1% sau 1,5% gelatină la soluția de zahăr și eventual cu puțin acid boric.

Se unge mai întâi o lamă de sticlă cu soluție nutritivă, avînd grijă ca mediile cu agar sau gelatină să fie întinse calde pe lamă. Pe această peliculă de mediu nutritiv se presară polen, germinarea fiind facilitată de densitatea granulelor de polen. Uneori, germinarea acestora este stimulată prin împrăștierea pe mediul nutritiv a unui amestec de polen de la diferite specii.

Germinarea polenului necesită mult oxigen încît lamele nu trebuie acoperite cu lamele, ci se trec în cameră umedă, controlîndu-se starea granulelor de polen la intervale de 15—30 minute. S-a observat că polenul unor specii de plante germinează mai bine la întuneric.

Menționăm că polenul nu poate să germineze decît dacă a ajuns la maturitate; dar nu totdeauna maturitatea polenului coincide cu deschiderea anterelor. De asemenea, trebuie să se țină seamă și de faptul că intervalul de timp dintre diseminare și începutul germinării polenului variază, în funcție de specie, între cîteva minute și cîteva ore. De aceea, pentru inițiere în metoda culturii tuburilor polinice, trebuie să se încerce în primul rînd polenul care germinează ușor, de exemplu cel de *Impatiens sultani*, care într-o soluție de 10% zahăr germinează în 30 minute.

6.3.1.11. METODA CU CELOFAN

În cazul utilizării soluțiilor nutritive pentru germinarea polenului s-a elaborat metoda cu celofan pentru ca granulele de polen să nu se afunde prea mult în aceasta. Astlel, soluția nutritivă la care nu s-a adăugat agar-agar sau gelatină se întinde pe lamă și se acoperă cu o bucată de celofan pe care se împrăstie polen, înainte de a ține lama cîtva timp în camera umedă.

6.3.1.12. ANALIZA CULTURILOR DE TUBURI POLINICE

Tuburile polinice în creștere se examinează cel mai bine „in vivo”, cu microscopul cu contrast de fază. Pentru aceasta se scoate lama din camera umedă și se acoperă cu o lamelă, iar eventualele bule de aer care

apar între cele două lame de sticlă se elimină adăugînd soluție nutritivă sub lamelă.

Fixarea și colorarea tuburilor polinice cultivate se face cel mai bine cu acid carmin-acetic, în felul acesta ne mai riscînd spălarea preparatului de pe lamă. Tuburile polinice astfel colorate pot fi incluse în Celodal după *Haustein* devenind astfel preparate durabile (permanente). După colorare, se adaugă puțin Celodal tratat în prealabil cu acid acetic (pîna la 30%) și cu 5% acid carmin-acetic. Pentru ca în preparate să nu apară bule de aer, trebuie să se ia din Celodalul mult diluat o picătură cît mai mare.

Intrucît amestecul format din Celodal, acid acetic și carmin-acetic nu se poate păstra decît puțin timp, acesta trebuie să se prepare în cantități mici.

Se pune apoi puțin din amestecul acesta deasupra tuburilor polinice colorate și se acoperă cu o lamelă. Preparatul astfel obținut se întărește în cîteva ore sau zile, în funcție de gradul de diluare al mediului de includere.

Un preparat de tub polinic colorat cu acid carmin-acetic poate fi inclus și în Euparal.

Studiul structurilor plasmatiche mai fine din tuburile polinice necesită o prefixare a acestora cu OsO_4 și tratarea în continuare. Pentru ca în timpul tuturor acestor operațiuni să nu se piardă prea multe tuburi polinice de pe lamă, se recomandă folosirea ca mediu nutritiv, pentru germinare, cel cu adaus de gelatină.

Studiul spermatozoizilor de Pteridophyta se face de obicei „in vivo”, cu microscopul cu contrast de fază sau în cîmp întunecat. Flagelii acestora devin foarte clar vizibili și în cîmp luminos dacă se trece o soluție de iod prin preparat. În acest caz, spermatozoizii sînt fixați și își schimbă puțin forma, iar flagelii se colorează în galben brun.

Obținerea de preparate permanente din spermatozoizi se face folosind metoda cu frotiul după Breslau, cu soluția albastru opal floxinrodamin (se vinde gata preparată).

După această metodă, se pun pe o lamă protalele, când anteridiile sînt mature, se strivesc, se scot spermatozoizii cu o picătură de lichid, lîngă care se așază o picătură (la fel de mare) din soluția colorantă și se amestecă ambele picături cu un ac. Acest amestec este apoi întins cu ajutorul unei a doua lame, avînd grijă ca frotiul să fie potrivit de consistent. Dacă se urmărește o colorare foarte intensă a nucleelor, se țin frotiurile încă umede, cca 30 minute, într-o cameră umedă înainte de a le usca la aer. Dacă nu se face o colorație specială a nucleelor, frotiul se usucă imediat.

După această colorare, spermatozoizii apar albi pe fond albastru, iar nucleele acestora sînt colorate în roșu deschis.

6.3.2. MACROSPORII ȘI GAMETOFIȚII FEMININI

La angiosperme, dezvoltarea macrosporilor începe destul de tîrziu, încît chiar atunci cînd în antere s-au format deja tetradele de microspori, în primordiile ovulelor se află încă celula mamă a macrosporilor (celula macrosporogenă).

Dezvoltarea macrosporilor se studiază cel mai bine pe secțiuni efectuate la microtom prin material fixat cu amestecul Navașin sau cu acid cromacetic mijlociu. Pentru analize orientative, fixarea materialului de studiu se poate face cu amestecul AFE (alcool-formol-acid acetic).

Colorarea secțiunilor împarafinate se face în cazul cel mai simplu cu o soluție de hematoxilină, la care co-

lorantul și mordantul acționează în aceeași soluție. Colorarea cu hematoxilină ferică este avantajoasă mai ales în cazul observării celor mai fine diferențieri. Rezultate excelente se obțin de obicei cu o colorație multiplă, de exemplu: safranină-verde de lumină sau cu safranină-violet-cristal-verde de lumină.

Studiul meiozei în celulele macrosporogene se efectuează de obicei pe secțiuni împarafinate din material fixat cu o soluție care conține acid cromic. Una dintre cele mai bune colorări este cea cu violet de gențiană, dând rezultate clare și în cazul secțiunilor mai groase.

La unele specii, meiozele celulelor macrosporogene se pot observa și în preparate obținute prin strivirea fragmentelor de ovar fixate cu un amestec de alcool-acid acetic glacial, care se macerează apoi în HCl și se colorează cu acid carmin acetic. Ovulele se detașează apoi de placenta cu un ac spatulat și se analizează într-o picătură de acid carmin-acetic.

6.3.2.1. GAMETOFITII FEMININI LA ANGIOSPERMAE (SACI EMBRIONARI MATURI)

În majoritatea cazurilor, studiile asupra sacului embrionar se fac pe secțiuni efectuate la microtom prin ginecee recoltate în diferite stadii de dezvoltare și incluse în parafină. Analiza acestuia „in vivo” este posibilă numai la unele specii dintre *Orchidaceae*, genurile *Monotropa* și *Torrenia*.

De multe ori, ultimele stadii de dezvoltare ale sacului embrionar se găsesc în mugurii floralii cu puțin înainte de deschiderea lor.

Fecundația are loc când petalele încep să se vestească, iar diferitele etape ale fecundației se studiază, de asemenea, pe material împarafinat și secționat la microtom.

Colorarea acestor secțiuni se face în mod frecvent prin reacția Feulgen, pentru contrastarea mai evidentă a nucleelor spermatice atunci când se mai găsesc încă în conținutul dens al sinergidelor. Prin această colorare se poate evidenția, de asemenea, contopirea nucleului oosferei cu nucleul gametului masculin, deși nucleul oosferei reacționează negativ la Feulgen.

Pentru studiul diferitelor etape ale fecundației se recomandă, de asemenea, colorația cu violet de gențiană, cea cu safranină verde de lumină sau cea cu safranină-violet de gențiană-verde de lumină.

Embriogeneza. Formarea și dezvoltarea embrionului se analizează de obicei pe material împarafinat și secționat la microtom. Pentru aceasta este suficientă fixarea obiectelor de studiu cu amestecul alcool-formol-acid acetic glacial și colorarea cu hematoxilină Delafield sau după Erhlich.

Embrionii se mai pot observa și prin transferarea pe o lamă a ovulelor încă transparente și strivirea lor în una două picături de soluție de cloralhidrat.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Andrei M., Anghel I., Popescu I., Stoica E., Lucrări practice de biologie vegetală, Editura didactică și pedagogică, București, 1981.
- Andrei M., Rădulescu Didona, Caiet pentru tehnica preparării și conservării materialului biologic. Tehnica obținerii preparatelor microscopice, Centrul de multiplicare, Universitatea București, București, 1973.
- Bianu V. V., Optica geometrică, Editura tehnică, București, 1962.
- Braune W., Leman A., Taubert H., Pflanzenanatomisches Praktikum, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967.
- Chamberlain I., Methods in plants histology, Chicago, 1905.
- Dop Paul et Gautie Albert, Manuel de technique Botanique histologie et microbiologie vegetales, Edit. J. Lamarre, Paris, 1928.
- Dumitru V., Conservarea fructelor și legumelor în mediul lichid, Natura, seria biologie, nr. 3, București, 1965.
- Genevès L., Manipulations de Botanique, Dunod, Paris, 1962.
- Genevois L., Coloration vitale et respiration, Protoplasma, 1928.
- Gherlach Dieter, Botanische Mikrotechnik, Georg Tieme Verlag, Stuttgart, 1977.
- Grințescu I., Botanica generală, Cluj, 1928 — 1934.
- Guilliermond A., Mangenot G., Plantefol L., Traité de cytologie végétale, Paris, 1933.
- Guilliermond A., Mangenot G., Précis de Biologie végétale, Paris, 1941.

- Ionescu M., Notă asupra montării Artropodelor mici și pieselor în preparate fixe, Bulet. Soc. Natur. din România, nr. 10, București, 1937.
- Jirariu Gh. Gabriela, Instrucțiuni pentru microscopie de Botanică, revista Natura, nr. 1, București, 1951.
- Jirariu Gh. Gabriela, Lucrări practice de morfologia plantelor (celula), revista Natura, nr. 5, 1952, nr. 1 1953, București.
- Langeron M., Précis de microscopie, 4^e édit. Paris, 1925.
- Langeron M., Précis de microscopie, 5^e edit. Paris, 1934.
- Langeron M., Précis de microscopie, Paris, 1949.
- Mangin Louis M., Sur les réactifs iodés de la cellulose, Bulletin de la Société botanique de France, Tome 35, Paris, 1888.
- Mănescu Creola, Baciuc Eugenia, Cosmin Silvia, Controlul biologic în pomicultură, Edit. Ceres, București, 1975.
- Morlova Irina și colab., Indrumător de lucrări practice la Botanică, partea I, Litogr. Ministerul Agric. și Silv. București, 1958.
- Moruzi Constanța, Andrei M., Lucrări practice de botanică generală, Edit. didactică și pedagogică, București, 1967.
- Ploaie G. P., Petre Zoe, Introducere în microscopia electronică, Editura Academiei R.S.R., București, 1979.
- Policard A., Bessis M., Locquin M., Traité de microscopie, Masson, Paris, 1957.
- Rădulescu Didona, Indrumări practice pentru studiul tesuturilor vegetale, revista Natura, nr. 3, București, 1953.
- Sass E., J., Botanical microtechnique, Oxford & Ibh., Publishing CO., Calcutta, Bombay, New Delhi, 1964.
- Schneider H., Die botanische Mikrotechnik, Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1922.
- Soran V., Folosirea microscopului cu contrast de fază în cercetările de biologie, revista Natura, nr. 4, București, 1961.
- Strasburger E., Koernicke M., Das botanische Praktikum, Ed., 7, Jena, 1923.

Tarnavschi I., T. Șerbănescu-Jitariu Gabriela,
Mitroiu-Rădulescu Natalia, Rădulescu Di-
dona, Practicum de morfologia și anatomia vegetală, Cen-
trul de multiplicare al Universității București, București,
1974.

Voinov N. D., Principii de microscopie, București, 1900.

Zarnea Gh., Microbiologie, Editura didactică și pedagogică,
București, 1963.

Zimmermann A., Die botanische Mikrotechnik, Jena, 1922.

Bun de tipar 21.XII.1982. Apărut 1983.

Coli editoriale 13.04. Coli de tipar 9,25.



Tiparul executat sub cd. 268
la întreprinderea Poligrafică Iași,
str. 7 Noiembrie nr. 49.

E R A T A

<i>Pag.:</i>	<i>Rind:</i>	<i>In loc de:</i>	<i>Se va citi:</i>
18	17 de sus	n=1,5	n=1,515
28	8 de jos	lentila	prisma
163	14 și 23 de jos	HCIN	HCl n
176	4 de sus	(directtiewarzw)	clorazol negru
235	18 de jos	vital	„in vivo“
236	9 de jos	cuprao	*cupric



BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lei 13,50



EDITURA CERES